

Etablierung einer 3R-Alternativmethode für die Chargenprüfung von bovinem Tuberkulin unter Berücksichtigung mykobakterieller Lipidantigene im Meerschweinchenmodell

Paul-Ehrlich-Institut



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biologin Christina Spohr

aus Fulda

1. Referent: Prof. Dr. Jörg Simon

2. Referentin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Tag der Einreichung: 06. Juli 2015

Tag der Disputation: 22. September 2015

Darmstadt 2015

D17



Inhaltsverzeichnis

1.	ABSTRACT	7
2.	ZUSAMMENFASSUNG	9
3.	EINLEITUNG	12
3.1.	Motivation	12
3.2.	Forschungsziele und Herausforderungen	13
3.3.	Vorgehensweise	14
4.	HINTERGRUNDINFORMATIONEN	15
4.1.	3R – Das Konzept von Russel und Burch	15
4.2.	Die Rindertuberkulose	17
4.2.1.	Ätiologie und Epidemiologie	17
4.2.2.	Klinik und Pathologie	17
4.2.3.	Diagnose, Therapie und Prophylaxe	18
4.2.4.	Brisanz	19
4.3.	Die Bedeutung der Humantuberkulose	20
4.4.	Tuberkulin – ein schwer standardisierbares Diagnostikum	21
4.5.	Die Diagnose von Tuberkulose – Hypersensitivierungs-reaktion Typ IV	24
4.6.	Tuberkulin-Hauttest zur Diagnose im Feld und zur Chargenprüfung im Labor	25
5.	MIKROBIOLOGISCHE UND IMMUNOLOGISCHE GRUNDLAGEN	26
5.1.	Eigenschaften von Mykobakterien	26
5.2.	Bacille Calmette-Guérin und Mycobacterium bovis-Stamm AN5	28
5.3.	Antigenpräsentationsmoleküle	30
5.3.1.	MHC-Moleküle	30

5.3.2.	CD1-Moleküle	31
5.4.	Antigenpräsentationssysteme und T-Zellaktivierung	33
5.4.1.	Antigenprozessierungswege	34
5.4.2.	Interaktion mit TCR – T-Zellaktivierung	38
5.5.	Die Primärinfektion mit Mykobakterien	40
6.	MATERIAL UND METHODEN	41
6.1.	Der Tuberkulin-Hauttest	41
6.1.1.	Sensibilisierung der Meerschweinchen an Tag 0	41
	Attenuierter Lebendimpfstoff BCG (Bacille Calmette-Guérin)	41
	Hitze-inaktivierte Feuchtmasse des M. bovis-Stamms AN5 (iAN5)	41
6.1.2.	Tuberkulinisierung der Meerschweinchen an Tag 30	42
6.1.3.	Auslesen der Hautläsionen an Tag 31	43
6.1.4.	Statistische Analyse des Tuberkulin-Hauttests	43
6.2.	Der ex vivo Tϵ-Proliferations-Assay	44
6.2.1.	Sensibilisierung der Meerschweinchen an Tag 0	44
6.3.	Blutentnahme und Tϵ-Proliferations-Assay an Tag 30	45
6.3.1.	Durchflusszytometrische Analyse an Tag 35	48
6.4.	Statistische Analyse des ex vivo Tϵ-Proliferations-Assay	49
6.5.	gpTNFα-ELISA zur Untermauerung des ex vivo Proliferationsassays	50
6.6.	Klonierung von Meerschweinchenzytokinen (gpZytokine)	51
6.6.1.	RNA-Isolation aus Meerschweinchen-PBMCs (gpPBMCs)	51
6.6.2.	Reverse Transkriptase-PCR	51
6.6.3.	PCR	52
6.6.4.	Ligation in den pGEM-T easy-Vektor	54
6.6.5.	Transformation von <i>E.coli</i> mit pGEM-gpIL4 bzw. pGEM-gpGM-CSF	54
6.6.6.	Transfektion von PlatinumE-Zellen	56
6.6.7.	Transduktion von 38B9-Zellen	57
6.6.8.	Limiting Dilution und Ernte der Zytokine	58
6.6.9.	Funktionsüberprüfung und Titration der Meerschweinchen-Zytokine	58
	Aufbereitung von Meerschweinchen-PBMCs und Monozytenisolation	58
6.6.10.	FACS-Färbung	60

6.7.	Der ex vivo Lipid-Assay	61
7.	ERGEBNISSE	62
7.1.	Der Tuberkulin-Hauttest zeigt Dosisabhängigkeit	62
7.2.	Der ex vivo Tζ-Proliferations-Assay quantifiziert antigenspezifische Tζ-Proliferation bei sensibilisierten Meerschweinchen	64
7.2.1.	Die Sensibilisierungsstrategie beeinflusst die Intensität der späteren Immunantwort	68
7.2.2.	Der T ζ -Proliferations-Assay zeigt einen dosisabhängigen Bereich über zwei bis drei Logarithmusstufen	70
7.2.3.	Die TNF α -Sekretion korreliert mit der T ζ -Proliferation	73
7.2.4.	Der T ζ -Proliferations-Assay misst spezifische Immunantworten	75
7.2.5.	Die mittels wiederholten T ζ -Proliferations-Assays ermittelten Wirksamkeitsschätzer liegen eng beieinander	77
7.2.6.	Der T ζ -Proliferations-Assay ermittelt gleiche Wirksamkeitsschätzer wie der Tuberkulin-Hauttest	78
7.2.7.	Lipidantigene zeigen im Proliferationsassay eine höhere Reaktogenität als im Hauttest	86
7.3.	Die rekombinant exprimierten Meerschweinchenzytokine steigern die CD1-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten	88
7.3.1.	Der Lipid-Stimulations-Assay detektiert antigenspezifische T-Zell-Antworten	91
8.	DISKUSSION	95
8.1.	Der Tζ-Proliferations-Assay kann den schwach reproduzierbaren TST bei der Chargenprüfung ablösen	95
8.2.	Ein CFSE-basierter Proliferationsassay ermöglicht weitergehende Studien an antigenspezifischen T-Zellen	97
8.3.	Die gemessenen T-Zell-Antworten sind antigenspezifisch	97
8.4.	Die Sensibilisierungsstrategie beeinflusst die später induzierte Immunantwort	98
8.5.	Mit der richtigen Sensibilisierung sind die Tiere repetitiv für Blutentnahmen nutzbar	101
8.6.	Der Tζ-Proliferations-Assay misst präzise Dosisabhängigkeiten trotz genetischer Varianz der Meerschweinchen	102
8.7.	Der Tζ-Proliferations-Assay ist präziser, sensitiver und objektiver als der TST	103

8.8.	Der Tζ-Proliferations-Assay ist in der Durchführung flexibel und effizient	104
8.9.	Der Herstellungsprozess beeinflusst das Ergebnis der Wirksamkeit in beiden Testsystemen nur geringfügig	105
8.10.	Rekombinant exprimierte Meerschweinchenzytokine sind funktionell	107
8.11.	Basierend auf dem Tζ-Proliferations-Assay konnte ein weiteres Tool für die Untersuchung von T-Zell-Antworten auf mykobakterielle Lipidantigene etabliert werden	108
8.12.	Fazit	111
9.	ANLAGEN	112
10.	LITERATURVERZEICHNIS	115
11.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	122
12.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	124
13.	PUBLIKATIONEN	128
14.	CURRICULUM VITAE	129
15.	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	130
16.	DANKSAGUNG	131

1. Abstract

Robert Koch already described experiments where he used Tuberculin for intradermal injection in guinea pigs [1–5]. Based on this work Clemens von Pirquet developed the Tuberculin Skin Test (TST) which is still used today for the diagnosis of tuberculosis [6]. Tuberculins are used *in vitro* and *in vivo*. Tuberculin is an antigen preparation obtained from the supernatant of mycobacterial cultures [7]. During the manufacturing process harvested supernatant is heat inactivated via steam, cleared and protein enriched by filtration or acid precipitation. Phenol is allowed to be added as a preserving agent [7]. Tuberculins are produced either from *Mycobacterium tuberculosis* culture for human use or from *Mycobacterium bovis* culture for bovine use. Different Tuberculins are defined according to the Mycobacteria strain they are based on [8–11]. The manufacturing process includes different empiric steps that are hard to standardize. So every single Tuberculin batch has to be tested before market release [12]. So far Tuberculins have been tested in animal experiments by using guinea pigs [7]. The current test procedures according to the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) rely on the sensitization of guinea pigs either with live or inactivated mycobacteria. Not less than four weeks later the flanks are shaved and different dilutions of a reference preparation and the test batch of tuberculin are injected intradermally. Doses are chosen to produce lesions ranging from 8 – 25 mm. Diameters are measured and the potency of the test batch is calculated by regression analysis. As a result of statistical analysis a dose response curve is obtained and the potency of the test tuberculin in relation to the reference tuberculin is determined [7].

According to § 2 and § 32 of the Tierimpfstoff-Verordnung the Paul-Ehrlich-Institute as Federal Institute for Vaccines and Biomedicines is the responsible institution in the federal republic of Germany for the state-controlled batch potency testing of tuberculin [13].

Due to the heat treatment, which is the crucial inactivation step during the manufacturing process, the majority of tuberculin antigens are denatured [14]. This impedes potency determination by molecular biological methods and is one of the reasons why tuberculins are still tested in an animal experiment. However, the animal test suffers from several drawbacks including the subjective read-out, the spatial limitations that only allow for few test replicates and/or dilutions, the poor reproducibility and a significant distress for the laboratory animals through the induction of painful, sometimes necrotizing lesions [15]. Therefore we aimed to establish a new method for batch potency testing of bovine Tuberculin. The new assay is based on the direct measurement of tuberculin-specific T cell proliferation because the cellular response is the underlying cause for the type IV hypersensitivity reaction measured in the

skin test [16–18]. The *in vitro* proliferation assay is developed in accordance to the 3R concept of Russel and Burch [5] and shall disburden laboratory animals during batch potency testing of Tuberculin. The lethal infection with virulent *Mycobacterium bovis* is replaced with another sensitization strategy by using inactivated wet mass of *Mycobacteria bovis* strain AN5. It was the aim to replace the most distress part of the animal experiment – the Tuberculin Skin Test, refine the method by using flow cytometry as an objective read-out.

For the new established method seven guinea pigs are sensitized with inactivated wet mass of *Mycobacterium bovis* strain AN5. On day 30 blood is obtained and Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) are purified via Ficoll gradient centrifugation. PBMCs are stained with Carboxyfluoresceinsuccimidylester (CFSE) and stimulated with Tuberculin in eight different dilutions. The response to a test batch is compared to a standard preparation. After 5 days CFSE dilution, as a measure for cell proliferation, is determined by flow cytometry [19–21].

Due to the complexity of the underlying immunological processes, the variability of the test results – in particular the differences between individual animals of one group – was relatively high with both methods. This is an observation that is frequently made with biological potency assays [15]. “However, in a direct comparison the proliferation assay was clearly more precise than the skin test. As this may indicate that the new assay yields more reliable test results, it is also important with respect to animal welfare, because it can help to avoid test repeats. Another aspect is the spatial limitations of the current test, which requires at least eight guinea pigs per test batch. With the proliferation assay a significant reduction of animal numbers can be achieved, because the format allows to test several batches in parallel. With this, the alternative approach is in accordance with the 3R concept proposed by Russel and Burch” [5,22]. The data presented in this thesis allow for the conclusion that the proliferation assay holds promise to replace the current potency assay for bovine Tuberculin.

Another aspect of the current thesis was to establish the techniques to study cellular immune responses of guinea pigs in general. The particular focus was on responses to defined mycobacterial lipid antigens. Since T cells recognize mycobacterial lipid antigens in the context of group I CD1 molecules it was necessary to generate CD1 positive antigen presenting cells (APCs) *in vitro* to detect CD1 restricted T cells [23,24]. To this end guinea pig cytokines were recombinantly expressed and used to stimulate guinea pig monocytes to express CD1. Subsequently, the APCs were used to stimulate lipid-specific T cells. Using this approach it could be demonstrated, that guinea pigs mount CD1 restricted T cell responses to Lipoarabinomannan (ManLAM) and Glucosemonomycolate (GMM) to a similar extend as observed in humans.

2. Zusammenfassung

Schon Robert Koch beschreibt Experimente, in denen er Meerschweinchen intradermal Tuberkulin injiziert. Basierend auf seiner Arbeit entwickelte Clemens von Pirquet den Tuberkulin-Hauttest, der bis heute zur Diagnose von Tuberkulose Anwendung findet. Tuberkuline werden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verwendet. Tuberkulin ist eine Antigenpräparation, die aus den Überständen von Mykobakterienkulturen gewonnen wird. Während des schwer zu standardisierenden Herstellungsprozesses wird der Überstand mit Dampf hitzeinaktiviert und zur Proteinanreicherung filtriert oder gefällt. Das Aufnehmen in Phenol dient Konservierungszwecken. Tuberkuline für die humanmedizinische Anwendung werden aus *M. tuberculosis*-Kulturen gewonnen; die für die Anwendung im Rind aus *M. bovis*-Kulturen. Weitere Tuberkuline sind nach dem jeweiligen Mykobakterienstamm, auf dem sie basieren, definiert. Jede Tuberkulincharge muss vor Marktzugang auf ihre Wirksamkeit getestet werden. Bis heute werden Tuberkuline *in vivo* im Meerschweinchen getestet. Der Test wird in Übereinstimmung mit dem Europäischen Arzneibuch durchgeführt und basiert auf einer Sensibilisierung der Meerschweinchen mit entweder lebenden oder inaktivierten Mykobakterien. Mindestens vier Wochen später werden die Flanken rasiert und verschiedene Konzentrationen eines Referenztuberkulins und der einer Testcharge intradermal injiziert. Die Dosis wird dabei so gewählt, dass Läsionen mit einem Durchmesser zwischen 8 – 25 mm entstehen. Die Durchmesser werden vermessen und die Wirksamkeit der Testcharge mittels Regressionsanalyse ermittelt. Damit erhält man eine Dosis-Wirkungskurve und die Wirksamkeit der Testcharge wird anhand der Wirksamkeit des Referenztuberkulins berechnet.

Während der Hitzeinaktivierung wird ein Großteil der proteinergeren Antigene im Tuberkulin denaturiert. Das erschwert eine rein molekularbiologische Wirksamkeitsprüfung und ist der Primärgrund für die Notwendigkeit des Tierexperiments. Der Tuberkulin-Hauttest hat einige Nachteile, wie den subjektiven Endpunkt bei der Datenerhebung, die Platzbegrenzung des Tierkörpers für nur wenige Testkonzentrationen, der geringen Reproduzierbarkeit und dem Stress für die Labortiere durch die Induktion von schmerzhaften, teilweise nekrotisierenden Läsionen. Daraus resultiert das Ziel in dieser Dissertation eine neue Methode für die Chargenprüfung von bovinen Tuberkulinen zu etablieren. Die neue Testmethode basiert auf direkter Messung tuberkulin-spezifischer T-Zell-Proliferation, da die zelluläre Immunantwort einer Hypersensitivierungsreaktion Typ IV folgt und auch diese im Hauttest abgerufen wird. Der *in vitro* Proliferationsassay wurde in Übereinstimmung mit dem 3R-Konzept von Russel und Burch etabliert und soll die Tiere während des Experiments entlasten. Die letale Infektion mit virulentem *M. bovis* wurde mit der Nutzung hitzeinaktivierter Feuchtmasse des *M. bovis*-

Stamms AN5 ersetzt. Es war Ziel den für die Tiere am stressigsten Teil zu ersetzen und die Methode mit objektiver Datenerhebung mittels Durchflusszytometrie zu verbessern.

Für die neu etablierte Methode werden mindestens sieben Meerschweinchen mit hitzeinaktivierter Feuchtmasse des *M.bovis*-Stamms AN5 sensibilisiert. An Tag 30 wird Blut entnommen und PBMCs (engl. Peripheral blood mononuclear cells) mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die PBMCs werden mit CFSE (Carboxyfluoresceinsuccimidylester) gefärbt und mit acht verschiedenen Tuberkulin-Konzentrationen stimuliert. Dabei wird die T-Zell-Antwort auf eine Testcharge mit der auf ein Referenztuberkulin verglichen. Nach fünf Tagen wird die Verringerung der CFSE-Färbung als Messpunkt für Zellproliferation mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Wegen der Komplexität der zugrunde liegenden immunologischen Prozesse, ist die Variabilität der Ergebnisse in beiden Methoden – besonders die Unterschiede zwischen den Einzeltieren einer Gruppe – relativ hoch. Diese Beobachtung wird aber regelmäßig bei biologischen Wirksamkeitsprüfungen gemacht. Trotzdem war der Proliferationsassay im direkten Vergleich zum Hauttest wesentlich präziser. Wenn das verheißt, dass die neue Methode wesentlich verlässlichere Daten produziert, ist das zusätzlich ein Argument in Richtung Tierschutz, da damit Testwiederholungen vermieden werden könnten. Ein weiterer Fakt ist die begrenzte Testfläche auf dem Meerschweinchenkörper, der mindestens acht Tiere pro Experiment erforderlich macht. Mit dem Proliferationsassay können Tierzahlen reduziert werden, da der experimentelle Aufbau das parallele Testen von mindestens zwei Chargen erlaubt. Auch das ist eine alternative Anwendung in Übereinstimmung mit dem 3R-Konzept von Russell und Burch. Die in dieser Dissertation präsentierten Daten erlauben die Schlussfolgerung, dass die neue Methode die bisherige Wirksamkeitsprüfung für bovine Tuberkuline ersetzen kann.

Ein weiterer, von der Tuberkulinprüfung unabhängiger Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Technik, mit Hilfe derer die T-Zell-Antwort von Meerschweinchen gegen mykobakterielle Lipidantigene untersucht werden kann. Da T-Zellen Lipidantigene im Zusammenhang mit Gruppe I CD1 Molekülen erkennen, war es nötig zuerst CD1-positive antigenpräsentierende Zellen (APCs - engl. *antigen presenting cells*) *in vitro* zu generieren. Dafür wurden entsprechende Meerschweinchenzytokine rekombinant exprimiert. Mit diesen Zytokinen wurden Meerschweinchen-Monozyten aus dem peripheren Blut zur CD1-Expression angeregt und anschließend als APCs im Proliferationstest eingesetzt. So konnte gezeigt werden, dass T-Zellen mykobakteriell-sensibilisierter Meerschweinchen –ähnlich wie beim Menschen – eine zelluläre Immunantwort gegen die mykobakteriellen Lipidantigene Lipoarabinomannan (ManLAM) und Glukosemonomykolat (GMM) ausbilden.



3. Einleitung

3.1. Motivation

In den Biowissenschaften werden viele Fragen mittels Tierexperiment beantwortet. Nicht nur in der Grundlagenforschung ist das Tierexperiment notwendige Methode, sondern vor allem auch in angewandter Forschung hinsichtlich der Arzneimittelsicherheit sind Tierversuche nach wie vor weit verbreitet. Seit 1897 wurden Arzneimittel oder Seren bereits geprüft, bevor sie Anwendung im Menschen fanden [26], allerdings gilt der *Thalidomid*-Skandal Ende der fünfziger Jahre des 20. Jahrhunderts als Geburtsstunde der *modernen* Arzneimittelsicherheit. In der Bundesrepublik Deutschland wurde daraufhin ein Arzneimittelgesetz (AMG) verabschiedet, um spezifische Arzneimittel, Diagnostika, Blutprodukte, Vakzine, Gewebezubereitungen und Biologika sowohl für die humanmedizinische, als auch für die veterinärmedizinische Anwendung mittels Tierversuch auf Wirksamkeit und Sicherheit vor Inverkehrbringen zu prüfen [12]. Diese Gewährleistung von Patientenschutz und Forschungsinteressen führten somit bis heute zu einem stetigen Anstieg der benötigten Versuchstiere [27]. Von 2004-2009 stieg die „Anzahl der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere“ von 2.265.489 auf 2.786.331 [28]. Ethische und wirtschaftliche Konzepte hinsichtlich der Nutzung von Labortieren fassten Russel und Burch im so genannten 3R-Konzept ab den 1950er Jahren zusammen [5]; (Siehe Abschnitt 4.1). Dieses Konzept strebt an, Tierversuche in ihrer Aussagekraft zu verbessern (Refinement), Tierzahlen zu reduzieren, Leid und Schmerz während des Experiments für jedes individuelle Tier zu reduzieren (Reduction) und durch Nutzung fortschreitender Technik schließlich auf das Tierexperiment zu verzichten und vollständig auf molekularbiologische und *in vitro*-Alternativen zurück zu greifen (Replacement) [5].

Das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) als Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel ist gemäß § 2 und § 32 der Tierimpfstoff-Verordnung zuständige Institution der Bundesrepublik Deutschland für die staatliche Chargenprüfung von immunologischen Tierarzneimitteln, wie Seren, Impfstoffen, Immunmodulatoren und Tuberkulinen [13]. Die Abteilung für Veterinärmedizin am Paul-Ehrlich-Institut hat darüber hinaus einen ihrer Forschungsschwerpunkte auf der Etablierung von Alternativmethoden von Tierversuchen in Übereinstimmung mit dem 3R-Konzept und § 26 Arzneimittelprüfrichtlinien Absatz 1 des deutschen Arzneimittelgesetzes (AMG). Darin ist gefordert, dass die Arzneimittelprüfmethoden „dem jeweils gesicherten Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse entsprechen“ und „laufend an diesen anzupassen“ sind und „insbesondere Tierversuche durch andere Prüfverfahren zu ersetzen sind, wenn dies nach dem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse im Hinblick auf den Prüfungszweck vertretbar ist“ [12].

3.2. Forschungsziele und Herausforderungen

Hauptziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Alternativmethode für das gesetzlich geforderte und bereits bestehende Tierexperiment für die Chargenprüfung von bovinen Tuberkulinen im Meerschweinchenmodell in Anlehnung an das 3R-Konzept von Russel und Burch.

Die aktuelle Methode – der so genannte Tuberkulin-Hauttest (engl. *Tuberkulin Skin Test* (TST))– wird in Anlehnung an die Monografie 01/2008:0536 des Europäischen Arzneibuchs im Meerschweinchen [7] seit den 1950er Jahren [15] für die Wirkstärkenbestimmung jeder Tuberkulinpräparation angewendet, weist jedoch deutliche Mängel auf: Die Erhebung der Messdaten ist oft unpräzise und subjektiv (Siehe Abschnitt 6.1). Die Fläche der Meerschweinchenhaut begrenzt die Menge an Testreplikaten und/oder Testkonzentrationen. Außerdem ist der TST schwach reproduzierbar und induziert psychisch sowohl Stress als auch physisch geschwollene Rötungen und Entzündungen auf der Haut, die teilweise nekrotisierend aufbrechen und somit Schmerzen für die Labortiere nach sich ziehen [15].

Konkretes Ziel war es, die Messdatenerhebung zu verfeinern und einen objektiveren Endpunkt zu finden (Refinement). Die Verbesserung der Datenerhebung entlastet in diesem Fall das einzelne Tier, da auf eine *ex vivo* Möglichkeit und die Nutzung der Durchflusszytometrie zurückgegriffen werden sollte. Zusätzlich sollte die Reproduzierbarkeit des Tests mit einer verfeinerten Datenerhebung gesteigert werden, so dass Versuchswiederholungen entfallen, was zum Einsparen von Tieren führen wird (Reduction). Hinzukommend sollte die *ex vivo-Methode* dahingehend optimiert werden, dass die Zellausbeute durch Blutentnahme und PBMC-Aufreinigung so gesteigert wurde, dass mehrere Tuberkulin-Chargen parallel getestet werden können. Auch dieser Aspekt wird die Tierzahlen reduzieren können (Reduction). Letztlich sollte der Tuberkulin-Hauttest ersetzt werden, so dass der Teil des Tierexperiments, der die Meerschweinchen am stärksten belastet, gänzlich entfällt und lediglich Blut narkotisierter Tiere für den Test benötigt werden wird (Replacement). Der vollständige Verzicht auf Tiere war nicht Ziel der Arbeit, denn im Fall von Tuberkulin ist derzeit eine rein molekularbiologische Wirkstärkenermittlung der komplexen mykobakteriellen Antigenpräparation aufgrund des Herstellungsprozesses nicht ohne weiteres möglich [14,29].

Eine Tuberkuloseinfektion zeigt beim Meerschweinchen einen sehr ähnlichen Verlauf wie beim Menschen [30]. Als Challengemodell ist das Meerschweinchen daher bereits gut etabliert. Es sollte darüber hinaus aber auch für vakzinologische und immunologische Experimentansätze zur Verfügung stehen. Weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Überprüfung und Erweiterung der etablierten Methode zur Beantwortung immunologischer Fragestellungen im Meerschweinchenmodell. Die Herausforderung bei der Arbeit mit Meerschweinchen

ist die Begrenzung der kommerziell erwerblichen Analysereagenzien für dieses Tiermodell. Auf dem biotechnologischen Markt sind derzeit kaum Reagenzien für Meerschweinchen kommerziell erhältlich, so dass das Meerschweinchen als Versuchsmodell verglichen zu Maus und Ratte seltener vertreten ist. Da die Nutzung von Meerschweinblutzellen angestrebt wurde, war die Frage zu Beginn der Arbeit, unter welchen Kulturbedingungen Blutzellen des Meerschweinchens zu kultivieren sind. Des Weiteren galt es zu überprüfen, welche Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper für aussagekräftige durchflusszytometrische Untersuchungen kommerziell erhältlich sind und durch auftretende Kreuzreaktivität nutzbar sind. Sämtliche Meerschweinchenzytokine, die benötigt wurden, mussten mittels rekombinantem Expressionssystem selbst generiert und auf ihre Funktion überprüft werden. Zum Schluss sollte ein funktionsfähiges, stabiles *ex vivo* System zur Verfügung stehen, das die nötigen Komponenten des Immunsystems in Bezug auf eine Immunantwort gegen mykobakterielle Lipidantigene enthält und das *in vivo* System insoweit simuliert, dass das Meerschweinchenmodell für die Forschung im Kampf gegen Tuberkulose zugänglich gemacht werden kann.

3.3. Vorgehensweise

In dieser Arbeit wurde zunächst eine Alternativmethode zur gesetzlich geforderten Chargenprüfung von Tuberkulinen am Beispiel von bovinem Tuberkulin entwickelt, um § 26 Arzneimittelprüfrichtlinien Absatz 1 des deutschen Arzneimittelgesetzes (AMG) Folge zu leisten und bestehende, mangelhafte Tierexperimente „durch andere Prüfverfahren zu ersetzen“ [12]. In diesem ersten Projektteil werden eine Etablierungsphase und erste Validitätsprüfungen des neuen Testsystems dargelegt.

Im zweiten Teil des Projekts wurde diese Methode verfeinert und das *in vitro* System um antigenpräsentierende Zellen erweitert, um das Meerschweinchenmodell für gezielte, immunologische Fragestellungen, die zum Verständnis der Immunantwort auf individuelle mykobakterielle, CD1-restringierte Lipidantigene beitragen sollen, zugänglich zu machen. Somit wird ein Beitrag zur weiteren Impfstoffentwicklung im Kampf gegen Tuberkulose geleistet.

4. Hintergrundinformationen

4.1. 3R – Das Konzept von Russel und Burch

William M.S. Russel und Rex L. Burch veröffentlichten 1959 ein Buch mit dem Titel „The Principles of Humane Experimental Technique“ und legten damit den Grundstein für den Tierschutz in der Forschung [5]. Es ist in zwei Teile gegliedert und bietet Vorschläge zur Umsetzung humaner Techniken im Labor, um Versuchstieren so viel Leid wie möglich zu ersparen, Experimente effizient zu konzipieren, so dass die aus Tierexperimenten gewonnene Daten entsprechend nutzbar sind und kein einziges Tier umsonst behandelt wurde. Versuche sollen im Voraus derart geplant werden, dass die genaue Anzahl an benötigten Tieren berechnet wird, so dass der Nutzen eines jeden einzelnen Tieres auch statistisch gerechtfertigt ist. Experimentatoren sollen sich bei der Planung und Konzeption eines Experiments über die Wahl des entsprechenden Modelorganismus für die jeweilige Fragestellung oder Überprüfung einer Hypothese bewusst werden und immer dann auf Tierexperimente verzichten, sobald es möglich ist. Im zweiten Teil ihres Buches erläutern Russel und Burch die so genannten „3R“ genauer. Die 3R stehen für **R**eplacement, **R**eduction und **R**efinement. Dabei soll *Replacement* den Experimentierenden dazu anhalten *in vitro*- oder *ex vivo*-Methoden einem Tierexperiment vorzuziehen, wenn erhobene Daten in der Alternativmethode die gleiche Qualität besitzen, wie die Daten, die zu gleicher Fragestellung aus Tierexperimenten erhoben würden. *Reduction* soll den Experimentierenden dazu anhalten, bei der Konzeption eines Experiments und Wahl der Untersuchungstechnik Tiere einzusparen. Die höchstmögliche Datenqualität soll mit der niedrigstmöglichen Anzahl an Tieren erhoben werden. Die Methoden sollen so gewählt sein, dass man die gleiche Datenmenge mit einer niedrigen Anzahl an Tieren oder mit der gleichen Anzahl an Tieren mehr Daten erheben kann. Mit *Refinement* meinen Russel und Burch, Leiden, Stress und Schmerz für jedes Tierindividuum so gering wie möglich zu halten und zwingend durchzuführende Experimente dahingehend zu verbessern, dass die individuelle Belastung eines Tieres mit dem Datengewinn nur unter Berücksichtigung des Tierschutzes zu rechtfertigen ist. Dabei erläutern sie, dass die 3R vor allem auf Vertebraten zu beziehen sind und z.B. auf Mikroorganismen zurückzugreifen sei, falls das möglich ist. *Replacement*strategien sind z.B. die Nutzung von Organ-, Gewebs- oder Zellkulturen. Um Tierzahlen zu reduzieren, empfehlen Russel und Burch hauptsächlich die präzise Planung eines Experiments im Vorhinein und meinen damit auch die Berechnung von benötigten Tieren für eine statistisch signifikante Aussage, denn das Nutzen von zu wenigen Tieren zahlt sich am Ende nicht aus, wenn Ergebnisse nicht signifikant sind und Versuche aus diesen Aspekten wiederholt werden müssen. Als mögliche *Refinement*strategien schlagen Russel und Burch vor, die Haltung der Tiere zu optimieren, in dem man eventuelle

Spieltriebe fördert, Nestbaumöglichkeiten zur Verfügung stellt und regelmäßiges Misten und Kontrolle der Tiere durch geschultes Personal sicherstellt. Hinsichtlich der Experimente sollten Tiere an Stimmen, an Berührungen durch Menschen und Herausnehmen aus dem Käfig gewöhnt werden, so dass sie bereits in diesen Situationen keinen Stress empfinden. Experimentierende sollten unter Umständen den Gebrauch von Anästhetika und Analgetika in Betracht ziehen und abwägen, welche Strategie die angenehmste für das Tier ist. Nur geschultes Personal sollte Tierexperimente durchführen, Erfahrungen durch ältere Mitarbeiter sind unbedingt an jüngere abzugeben und das Wohl des Tieres sollte zu jeder Zeit im Vordergrund stehen [5]. Seit 1959 haben sich viele Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler dem 3R-Konzept angenommen, um Alternativmethoden für Tierversuche zu etablieren, Tierzahlen auch bei steigender Nachfrage zu reduzieren und die Belastung eines Tieres im Tierexperiment gering zu halten. Regelmäßig tagt man auch über Implementierungen entsprechender Auflagen in Gesetze und von staatlicher Seite aus werden Bemühungen in dieser Richtung finanziell gefördert und vorangebracht. Auch die hier vorgelegte Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung unterstützt.

4.2. Die Rindertuberkulose

4.2.1. Ätiologie und Epidemiologie

Die Tuberkulose der Rinder ist eine durch *Mycobacterium bovis* (und auch durch *M. caprae*) verursachte, veterinärmedizinisch relevante Infektionskrankheit. Mit *Mycobacterium bovis* können auch Menschen, Schweine und andere Wiederkäuer infiziert werden. Für Geflügel verläuft eine Infektion mit *M. bovis* nicht pathogen. Verschiedene Wildtiere gelten als natürliches Reservoir für *M. bovis*. Epidemiologisch spielen z.B. Dachse in Großbritannien, das Possum in Neuseeland und bei dem jüngsten Rindertuberkulosegeschehen im deutschen Alpenraum Hirsche eine Rolle [31]. Somit handelt sich bei *M. bovis* um einen Zoonoseerreger. Die Ansteckung erfolgt aerogen über die Atemwege oder oral. Eine Ansteckung über Milch war vor Einführung der Pasteurisierung häufig, ist allerdings auch über andere Ausscheidungen wie Bronchialschleim, Vaginalschleim oder Sperma möglich. Mykobakterien bleiben außerhalb des Wirtes über mehrere Monate infektiös, sind dort allerdings nicht vermehrungsfähig. Rinder können sich *vice versa* auch mit *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. avium subsp. avium* und atypischen Mykobakterien anstecken, entwickeln dann aber häufig keine symptomatische Tuberkulose. Nur eine Infektion mit *M. bovis* und *M. caprae* sind laut *Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen* anzeigepflichtig [32] und sind tierseuchenrechtlich als Rindertuberkulose definiert [33].

4.2.2. Klinik und Pathologie

Die Tuberkulose des Rindes zählt zu den typischen zyklischen Allgemeininfektionen, bei denen Erreger sich erst am Infektionsort vermehren, um dann von dort aus über das Blut zu den Organen der Manifestation zu migrieren. In lokaler Abhängigkeit zum Infektionsweg entsteht ein so genannter Primärherd. Nach Aktivierung der zum Primärherd drainierenden Lymphknoten spricht man vom so genannten Primärkomplex, der ausheilt oder abgekapselt überdauert. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass ein Primärkomplex Ursprung einer Frühgeneralisation wird, die sich entweder in einer akuten Miliartuberkulose oder protrahierten Generalisation äußert. Postprimär ist die Ausbildung einer chronischen Organtuberkulose mit hämatogener, lymphogener oder intrakanalikulärer Ausdehnung möglich. Erst nachdem es basierend auf Einschmelzungsprozessen zu Einbrüchen in Hohlräume des Körpers, die nach außen führen, kommt, spricht man von einer offenen Tuberkulose. Eine Spätgeneralisierung bedingt eine vorangegangene Verkapselung des Primärkomplexes. Erst wenn sich das Wirt-Pathogen-Verhältnis auf Seiten des Erregers z.B. nach vorhergegangener Immunsuppression, verschiebt, tritt die Spätgeneralisierung auf. Innerhalb dieses Stadiums kann ein Tuberkulin-Hauttest falsch negativ ausfallen, was auf einer durch Immunsuppression un-

genügenden zellvermittelten Antwort zu begründen ist. Diese so genannte Niederbruchsphase geht klinisch mit einer Störung und Verschlechterung des Allgemeinzustands des Rindes einher. Heute werden klinisch manifeste Rindertuberkulosefälle vor allem aufgrund auffälliger Schlachtbefunde registriert. Die Lunge der Rinder ist das am häufigsten vorkommende Organ der Tuberkulosemanifestation, so dass sich eine chronische Lungentuberkulose mit Husten und körperlichem Abbau bis hin zur Abmagerung bemerkbar macht. Euter, Uterus, Darm und Hoden können ebenfalls betroffen sein. Die Früh- und Spätgeneralisation ist durch starkes Fieber mit meist letalem Ausgang gekennzeichnet [33].

Pathohistologisch sind proliferative und exsudative Entzündungen zu unterscheiden. Zu den proliferativen Entzündungsprozessen während der Tuberkulose ist die Entstehung von Granulomen (Tuberkel) mit nekrotischen Zentren zu zählen. Diese Zentren verkäsen erst und verkalken dann. Eiweißreiche Exsudate, die anschließende Koagulationsnekrosen mit sich ziehen, zählt man zu den exsudativen Entzündungsprozessen. Bei einer Infektion des Rindes mit *Mycobacterium tuberculosis* – dem Erreger der Humantuberkulose – entwickelt es in der Regel keinerlei klinischen Symptome. Ein Tuberkulintest kann nach erfolgreicher Infektion mit *M.tuberculosis* beim Rind allerdings für mehrere Monate positiv ausfallen. Außerdem ist bei der Schlachtung meist ein Primärkomplex visuell vorzufinden. Dieser erfordert dann diagnostische Abklärung. Dasselbe gilt für eine Infektion des Rindes mit *M.africanum* [33].

4.2.3. Diagnose, Therapie und Prophylaxe

Diagnostische Untersuchungen werden in der Bundesrepublik Deutschland heutzutage meist aufgrund auffälliger Schlachtbefunde veranlasst. Zum rein visuellen, mikroskopischen Nachweis von säurefesten Stäbchen, zu denen Mykobakterien zählen, werden Präparate von Direktausstrichen von auffälligen Organen oder Lymphknoten mittels Ziehl-Neelsen-Färbung angefertigt. Eine Differentialdiagnose von Rindertuberkulose mittels Kulturnachweis kann auf Grund des langsamen Wachstums von Mykobakterien bis zu acht Wochen dauern. Der Nachweis der IS6-1110-Sequenz mittels PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) kann im Genom der Bakterien ihre Zugehörigkeit zum Tuberkulose-Komplex weiter eingrenzen. [33]

Nach wie vor ist der Tuberkulin-Hauttest die Diagnosemethode der Wahl. Da der Tuberkulin-Hauttest auf einer Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ basiert, liegt ein positives Ergebnis dann vor, wenn 72 h nach intrakutaner Rindertuberkulininjektion eine Schwellung, Rötung und fühlbare Erwärmung der Injektionsstelle ablesbar wird. Um das Ergebnis von einer Infektion des Rindes mit anderen Mykobakterien, die nicht dem Tuberkulose-Komplex angehören, abzugrenzen, wird der so genannte Simultantest durchgeführt, bei dem an separat gelegener Körperstelle des Rindes ein Geflügeltuberkulin, das auf einer

M. avium ssp. avium-Kultur basiert, injiziert. Zur Diagnoseergänzung kann ein auf Interferon-gamma-Sekretion basierender ELISA (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) durchgeführt werden, der die diagnostische Sicherheit erhöhen kann. Zusätzlich sind Untersuchungen der auf die Insertionssequenz IS 6110 mittels RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) und Makrorestriktionsanalyse oder Spoligo- und MIRU-Typisierung möglich. [33]

Die Tuberkulose der Rinder gehört zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen [32]. Insofern ist eine diagnostische Differenzierung von *M.bovis*- bzw. *M.caprae*-Infektionen bedeutsam. Gemäß der Tuberkuloseverordnung sind Schutzimpfungen und Therapieversuche verboten [34]. Unter Nutzung des Bang-Verfahrens konnte die Rindertuberkulose in der Bundesrepublik Deutschland getilgt werden, indem man regelmäßige Tuberkulinisierungen der Rinderbestände durchgeführt, positiv reagierende Rinder separiert und geschlachtet hat. Außerdem wurden Kälber tuberkulosefrei aufgezogen und Bestände weiterhin tuberkulinisiert. Nach Abschaffung der Tuberkulinisierungspflicht 1997 dient die Schlachtkörperuntersuchung als der entscheidende Kontrollpunkt innerhalb der Rindertuberkuloseüberwachung. [33]

4.2.4. Brisanz

Die Bundesrepublik Deutschland ist seit 01. Juli 1996 amtlich tuberkulosefrei. Jüngste Ausbrüche von Rindertuberkulose wurden 2013 im Allgäu [35] und 2014 im Saarland gemeldet. Die Tuberkuloseverordnung wurde 1997 dahingehend geändert, dass eine Tuberkulinisierung der Rinder nur auf Verdacht auf Vorliegen einer Rindertuberkulose durchgeführt werden muss. Wie das Friedrich-Löffler-Institut informiert, steigt die Zahl der Rindertuberkulosefälle seit 2007 wieder an [35]. Die jüngsten Ausbrüche im Allgäu und im Saarland zogen eine weitere Neufassung der aktuellen Tuberkuloseverordnung nach sich. Das bedeutet, dass Rinder nun alle drei Jahre dem Simultantest unterzogen werden müssen [34]. Der Interferon-gamma-ELISA kann zur diagnostischen Sicherheit parallel durchgeführt werden; der Verdacht ist aber mittels Kultur oder PCR unbedingt zu bestätigen. Positiv-getestete Rinder werden separiert und getötet [34]. Abgesehen von der Infektionsgefahr für Landwirte, Veterinäre, Schlachter und Fleisch- und Milchprodukteverbraucher, bedeutet eine Keulung als Reaktion auf einen Rindertuberkuloseausbruch in einem Bestand einen enormen wirtschaftlichen Schaden für Landwirte, Molkereien und Fleischverwerter. Diese aktuellen Ausbrüche der Rindertuberkulose zeigen, dass adäquate Diagnostika nach wie vor notwendig sind. Daher wird auf absehbare Zeit auch zukünftig die gesetzlich geforderte Chargenprüfung der Tuberkuline am Paul-Ehrlich-Institut durchgeführt werden.

4.3. Die Bedeutung der Humantuberkulose

Nach HIV (engl. *Human Immunodeficiency Virus*) stellt Tuberkulose (TB) die zweithäufigste Todesursache beim Menschen durch Infektionskrankheiten weltweit dar. Die Weltgesundheitsorganisation WHO zählt in ihrem jährlichen Tuberkulosebericht eine Inzidenz von 9 Millionen Tuberkuloseinfizierten weltweit im Jahr 2013. Davon waren 1,1 Millionen Personen HIV-positiv. Die Mortalität lag in 2013 bei 1,5 Millionen Menschen, wovon 360.000 HIV-positiv waren. Die Inzidenz unter Kindern lag 2013 bei 550.000 Kindern und 80.000 Kinder, die HIV-negativ waren, starben an den Folgen einer Tuberkuloseinfektion. Die Mortalität unter Frauen lag bei 510.000, wovon 180.000 HIV-positiv waren. Während sich die Tuberkuloserate seit 1990 um 45 % verringert hat, stellt gerade in Entwicklungsländern die Co-Infektion mit HIV und TB ein enormes Gesundheitsproblem dar. Weltweit wussten nur 48 % der TB-Infizierten ihren HIV-Status. 2013 wussten 75 % der TB-Patienten in Afrika ihren HIV-Status. [36]

Die Franzosen Calmette und Guérin entwickelten zwischen 1908 und 1921 den einzigen bis heute verfügbaren Impfstoff gegen Tuberkulose – das so genannte BCG (*Bacille Calmette Guérin*). Dabei handelt es sich um einen attenuierten Lebendimpfstoff eines *Mycobacterium bovis*-Stamms, der in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppierungen unterschiedliche Protektivität aufweist [37]. Man vermutet, dass die unterschiedliche Effektivität des Impfstoffs im Zusammenhang mit den einzelnen BCG-Unterstämmen steht [37]. BCG bietet einen gewissen Schutz gegen die tuberkulöse Meningitis bei Neugeborenen [38]. Insofern wurde BCG bis in die 1990er Jahre auch in Deutschland an Neugeborenen verimpft [39], jedoch bietet BCG keinen Schutz gegen die klassische Lungentuberkulose beim Erwachsenen [40,41]. Da die Impfung bei Immundefizienten schwere Komplikationen verursachen kann und aufgrund der niedrigen Tuberkuloseinzidenz die Gefahr einer tuberkulösen Meningitis bei Neugeborenen sehr gering ist, wird die BCG Immunisierung in Deutschland nicht mehr empfohlen. In Ländern auf dem afrikanischen Kontinent mit einer hohen Tuberkuloseinzidenz macht es aber immer noch sehr viel Sinn zu impfen. Da BCG keinen Schutz gegen die epidemiologisch bedeutsamste Manifestation, die Lungentuberkulose, bietet, wird intensiv, aber bislang ohne durchschlagenden Erfolg an einem neuen, zuverlässigen Impfstoff gegen humane Tuberkulose gearbeitet. Im Jahr 2013 waren laut WHO 15 Impfstoffkandidaten in klinischen Studien [36].

Neben der Prävention von Tuberkulose kann man eine bestehende Infektion heutzutage erfolgreich therapieren. Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid, Ethambutol und Streptomycin sind dabei die gängigsten Antibiotika bzw. Tuberkulostatika [42,43]. Die Behandlung dauert mindestens zwei Monate, kann aber auch bis zu neun Monate in Anspruch nehmen [43].

Auch im Falle von Mykobakterien entwickelten sich inzwischen Resistenzen [44,45], die eine Behandlung erschweren und eine Prävention durch Impfungen wieder verstärkt in den Vordergrund rücken.

4.4. Tuberkulin – ein schwer standardisierbares Diagnostikum

Tuberkuline sind Antigenpräparationen aus Mykobakterienkulturen, die für die Diagnose von Tuberkulose in verschiedenen Spezies Anwendung finden [46]. Die Monografie 1/2008:0536 des europäischen Arzneibuchs definiert bovines Tuberkulin als ein „aus Stoffwechselprodukten und Lysaten von *Mycobacterium bovis*-Kulturen gewonnenes Präparat, mit dem sich bei einem gegen Mikroorganismen derselben Art sensibilisierten Tier eine verzögerte Überempfindlichkeit ('delayed hypersensitivity') feststellen lässt“. [7] Es handelt sich also um ein nicht definiertes Gemisch aus mykobakteriellen Peptiden, Proteinen, Lipopeptiden, Lipiden und Glycolipiden. Tuberkuline werden als Injektionslösungen dargereicht. Die Dosierung ist speziesabhängig. Die Injektion erfolgt intradermal. Beim Menschen wird üblicherweise ins mittig gelegene Areal der Palmarseite eines Unterarms, beim Rind in die seitliche Brustwand auf Höhe der Schulterblattgräte injiziert. Die Auswertung des Tests erfolgt beim Rind 72 h nach intradermaler Injektion mittels Schieblehre. Ein positives Resultat liegt bei einer Rötung (beim Menschen) bzw. Schwellung an der Injektionsstelle vor. Der Test fällt beim Menschen teilweise falsch positiv aus, da die Impfung mit BCG eine Sensitivität auslösen kann. Zudem – und das gilt auch für veterinärmedizinischer Anwendung – kann ein Hauttest falsch positiv ausfallen, wenn das getestete Individuum mit nicht tuberkulösen Mykobakterienspezies sensibilisiert ist. In der Veterinärmedizin spielt hier vor allem die Durchseuchung der Rinderbestände mit *M.avium ssp. paratuberculosis* eine Rolle [33]. Als Nebenwirkungen einer Tuberkulinisierung können an der Injektionsstelle als heiß empfundene Rötungen entstehen, die evtl. auch Juckreiz auslösen. In seltenen, besonders überempfindlichen Reaktionen treten Bläschen oder Nekrosen an der Injektionsstelle auf, die selbstständig wieder abheilen. Tuberkulin wird pharmakokinetisch innerhalb weniger Stunden mit Hilfe des Lymphsystems abgebaut [47].

Robert Koch gilt als Begründer des Tuberkulins, das er in den 80er Jahren des 19. Jahrhunderts entwickelte. Er extrahierte Tuberkelbazillen in Glycerin, nachdem er sie aus Patienten isoliert und kultiviert hatte und filtrierte das Extrakt [29]. Das sogenannte Koch's old Tuberculin (OT) wird heute nicht mehr verwendet auf Grund mangelnder Reinheit, schwankender Wirksamkeit, mangelnder Spezifität und schwieriger Standardisierung des Herstellungsprozesses. OT wurde bald von MA-100 abgelöst, das auch aus einem *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)-Kulturfiltrat bestand, verglichen zu OT allerdings eine polysaccharidfreie Formulierung darstellte [29,48]. Das Tuberkulin, in der Form wie es bis heute noch verwendet wird,

wurde zuerst 1934 hergestellt. Seine ursprüngliche Bezeichnung lautete SOTT (engl. *synthetic medium old tuberculin trichloroacetic acid precipitate*), das später in PPD (engl. *Purified Protein Derivative*) umbenannt und auch als solches bekannt und vertrieben wurde [29]. Die Herstellung von SOTT bzw. PPD erfolgte basierend auf Kulturen von *M. tuberculosis*, die zunächst mit Dampf in einem Arnold-Sterilisator behandelt wurden und dann zur Proteinaufreinigung und wiederholter Präzipitation mit Ammoniumsulfat weiter bearbeitet wurden [29]. Dieses Präparat beinhaltete nur wenige Polysaccharide, Nukleinsäuren und Lipide, so dass es besonders proteinreich war und deswegen als PPD bezeichnet wurde. Das so genannte PPD-S (PPD-Standard) bestand zu 92,9 % aus Proteinen, 5,9 % aus Polysacchariden und 1,2 % aus Nukleinsäuren [49]. PPD-S wurde 1952 von der WHO als Standard akzeptiert [50]. Alle weiteren Chargen sollten auf Verlangen der FDA (Food and Drug Administration, USA) ab 1978 anhand der Wirksamkeit von PPD-S eingestellt werden [51], so dass zur Ermittlung der biologischen Aktivität von Tuberkulinen ein Maß benötigt und entwickelt wurde. Eine internationale Einheit (IE) oder Englisch *international unit* (IU) wurde definiert als 0,028 µg PPD-S, addiert aus 0,02 µg PPD und 0,008 µg Salzen [29]. In den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) und Canada ist die Bezeichnung *tuberculin unit* (TU) das Maß für die biologische Aktivität von Tuberkulinen und definiert als 0,02 µg PPD-S [46]. 5 TU wurde basierend auf epidemiologischen Studien als Standarddosis für die intradermale Injektion in humanmedizinischer Anwendung festgelegt [29]. Bei der Anwendung von Rindertuberkulin im Rind werden 0,1 mL Injektionsvolumen mit 5000 internationale Einheiten empfohlen [52].

Tuberkuline rein molekularbiologisch auf ihre Wirkstärke zu überprüfen, in dem man definierte Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese oder Westernblot-Analyse detektiert und quantifiziert, ist nicht aussagekräftig genug. Massenspektrometrische Analysen von diversen Tuberkulinpräparaten werden gemacht [14] und offenbaren zwar ein gewisses systematisch wiederkehrendes Muster mykobakterieller Antigenzusammensetzungen in den Tuberkulinen, aber über die Wirkstärke eines einzelnen Präparats lassen sich damit keine konkreten Aussagen machen [14,53]. In der Monografie wird ebenso erwähnt, dass Tuberkuline während des Herstellungsprozess starker Hitze ausgesetzt sind, was zur Denaturierung der Proteinfraction in den Präparaten führt [7,14]. Um die Wirkstärke der Tuberkuline zu bestimmen, wird daher der in der Arzneibuch beschriebene Hauttest durchgeführt. Es ist nach wie vor nicht bekannt, welche Antigene im Tuberkulin für die Hypersensitivitätsreaktion verantwortlich sind. Vermutlich variiert dies je nach Tuberkulin und je nach Ausprägung der individuellen anti-mykobakteriellen Immunantwort. Vermutlich beruht die diagnostische Stärke von Tuberkulinen darauf, dass sie ein sehr breites Antigenrepertoire abdecken, das mykobakterielle Proteine, denaturierte Proteine, Peptide und Lipide umfasst. Aufgrund dieser Heterogeni-

tät und der damit verbundenen Schwierigkeit, die Wirkstärke von Tuberkulinen *in vitro* zu bestimmen, kann zum jetzigen Zeitpunkt auf die Sensibilisierung der Tiere und auf Primärkulturen nicht vollständig verzichtet werden.

Das Tierexperiment für die staatlich geforderte Chargenprüfung von bovinen Tuberkulinen sieht vor, dass mindestens acht Meerschweinchen mit einem Gewicht zwischen 400-600 g mittels intramuskulärer Injektion mit Feuchtmasse vom lebenden *M.bovis*-Stamm AN5, die in 0,5 mL einer 0,9 % NaCl-Lösung homogen suspendiert ist, sensibilisiert werden. Mindestens vier Wochen nach dieser Sensibilisierung werden die Flanken der Meerschweinchen rasiert, so dass nicht mehr als vier Injektionen je Körperseite gesetzt werden können. Die Tuberkulinverdünnungen sollen in PBS (engl. *Phosphate buffered saline*, pH 6,5-7,5) mit 0,005 g/l Tween[®]80 angesetzt werden. Es sollen nicht weniger als drei Konzentrationen sowohl vom Testtuberkulin als auch vom Referenztuberkulin angesetzt werden. Die Konzentrationen müssen so gewählt werden, dass die resultierenden Hautläsionen später einen Durchmesser zwischen 8 und 25 mm haben werden. Die Konzentrationsansätze sollen variabel unter Benutzung des Lateinischen Quadrats gesetzt werden. Die Durchmesser der Hautläsionen werden 24-28 h nach Tuberkulinisierung abgelesen in der Annahme, dass die Größe der Läsionen proportional zum Logarithmus der Konzentrationen des Tuberkulins ist. Der Test gilt als valide, sofern das Konfidenzintervall zwischen 50 und 200 % zur zuvor angenommenen Wirkstärke liegt. Der Wirkstärkenschätzer darf nicht unterhalb von 66 % und nicht oberhalb von 150 % der angegebenen Wirkstärke liegen. Die festgelegte Wirkstärke sollte mindestens 20.000 IE/mL betragen. [7]

4.5. Die Diagnose von Tuberkulose – Hypersensitivierungsreaktion Typ IV

Die Diagnose von Tuberkulose mittels Tuberkulin-Hauttest (TST) erfolgt nach einer klassischen Hypersensitivierungsreaktion Typ IV, der immer eine Sensibilisierung mit einem oder mehreren Antigenen vorausgeht. Eine Sensibilisierung ist definiert als „die Immunisierung eines Individuums mit einem Antigen, das später bei erneuter Exposition zu einer allergischen Reaktion führt“ [54]. Bei der Hypersensitivierungsreaktion Typ IV spricht man auch von einer verzögerten oder einer zell-vermittelten allergischen Reaktion. Reaktionen vom Soforttyp sind dagegen immer Antikörper vermittelt [54].

Der Tuberkulin-Hauttest stellt nach der Sensibilisierung die Auslösungsphase (engl. *Challenge*) für das Individuum dar. Die abgerufene Hautreaktion nach Tuberkulininjektion basiert auf der Aufnahme und Prozessierung der mykobakteriellen Antigene durch Langerhans-Zellen in der Haut. Diese interagieren mittels Antigenpräsentation mit inflammatorischen CD4-positiven T-Lymphozyten, die nach Aktivierung durch ihr passendes Antigen Zytokine wie Interferon-gamma (IFN γ) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF α) sezernieren. Außerdem sezernieren Keratinozyten der Haut aufgrund der veränderten Bedingungen in der Umgebung ebenso Chemokine und setzen so eine Signalkaskade in Gang, bei der hauptsächlich IL-1, IL-6, TNF α , GM-CSF, CXCL8, CXCL11, CXCL10 und CXCL9 beteiligt sind. Am Ende der Signalkaskade steht die Einwanderung von Monozyten an den Läsionsort, wo sie sich zu Makrophagen entwickeln, die Rekrutierung von weiteren T-Zellen veranlassen und eine sichtbare Rötung an der Injektionsstelle verursachen. Diese Entzündung in Form einer Rötung und Schwellung an der Injektionsstelle kann also nur ausgelöst werden, wenn das Individuum zuvor mit den entsprechenden Antigenen in Kontakt war.

4.6. Tuberkulin-Hauttest zur Diagnose im Feld und zur Chargenprüfung im Labor

In der Veterinärmedizin ist der Tuberkulin-Hauttest (TST) nach wie vor Mittel der Wahl, um eine Tuberkulose zu diagnostizieren. Obwohl es seit 2006 den auf Interferon- γ -Sekretion basierenden ELISA BOVIGAM® gibt [55], wird dieser lediglich zur Bestätigung eines positiven Hauttests empfohlen [34]. Der TST ist kostengünstiger und mit weniger Laboraufwand verbunden. Nichtsdestotrotz werden sowohl für den TST als auch für den IFN γ -ELISA Bovigam® Tuberkuline benötigt, deren immunologische Wirkstärke und Unbedenklichkeit vor Anwendung als Diagnostikum ermittelt und eingestellt werden muss, um Dosierungsfehler zu vermeiden. Die Wirkstärkenprüfung von Tuberkulinen wird im Meerschweinchen unter Nutzung des TST durchgeführt. Basierend auf den in dieser Chargenprüfung erhobenen Daten wird die richtige Dosis für die diagnostische Anwendung im Rind oder *ex vivo* im ELISA ermittelt.

Die Chargenprüfung erfolgt ebenso durch Auslösen einer Hypersensitivitätsreaktion Typ IV. Der TST für die Chargenprüfung ist biphasisch aufgebaut, so dass man von einer Induktionsphase sprechen kann, in der das Meerschweinchen sensibilisiert wird, sowie einer Challengephase, in der eine erfolgte Sensibilisierung mittels Tuberkulininjektion überprüft wird.

Im Feld fällt der Test häufig falsch positiv aus, wenn das Rind mit nicht-pathogenen Umweltmykobakterien sensibilisiert ist. Daraus resultierend wird an einer zweiten Hautstelle ein weiteres (meist) aviäres Tuberkulin injiziert, um Kreuzreaktivitäten auszuschließen. Bei der Chargenprüfung kann deswegen nicht auf das Tier verzichtet werden, da es sich bei Tuberkulin um ein komplexes Gemisch aus mykobakteriellen Antigenen handelt, die in unterschiedlicher Quantität und Qualität an (denaturierten) Proteinen, Peptiden, Lipopeptiden, Lipide und Glycolipide zusammengesetzt sind. Die immunologische Rolle der Einzelbestandteile ist nicht vollständig aufgeklärt, so dass chemische Analytik und Zuhilfenahme von Westernblots für Proteinquantifizierung oder Massenspektroskopie nur unzulängliche Ergebnisse über die Wirksamkeit einer einzelnen Charge liefern [14].

5. Mikrobiologische und immunologische Grundlagen

5.1. Eigenschaften von Mykobakterien

Mykobakterien bilden eine Gattung aus bis zu 100 Arten und gehören zur Familie der Mycobacteriaceae und zur Ordnung der Actinomyceten. Grundsätzlich sind Mykobakterien stäbchenförmig mit einer Länge zwischen 0,2-0,6 x 1,0-10,0 µm [33,56], verzweigen sich aber in Kulturen über einen längeren Zeitraum. Weiterhin werden sie zur Abteilung *Actinobacteria* beigeordnet, da sie auf genetischer Ebene zu den GC-reichen Bakterien gehören [57,58]. Zu dieser Gattung zählen apathogene Vertreter, aber auch pathogene Mykobakterien, die für Erkrankungen wie u.a. Tuberkulose, Lepra, Buruli-Ulkus und Paratuberkulose beim Rind verantwortlich sind [59]. Aus phylogenetischer Sicht kann man *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* und BCG, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae* und *Mycobacterium pinnipedii* zum Tuberculosis-Komplex zählen, da sie basierend auf 16S-RNA-Analysen relativ nah miteinander verwandt sind und Tuberkulose in verschiedenen Spezies auslösen können [60–62]. *Mycobacterium avium* dagegen, der Erreger der Geflügeltuberkulose gehört nicht zum Tuberculosis-Komplex [59]. Mykobakterien leben fakultativ intrazellulär. Pathogene Mykobakterien weisen ein sehr langsames, aerobes Wachstum auf Spezialnährböden auf [33]. *Mycobacterium leprae* ist bis jetzt nicht kultivierbar und nimmt damit eine Sonderstellung unter den pathogenen Mykobakterien ein. Außerdem gibt es unter den Mykobakterien saprophytäre und opportunistische Vertreter [33]. Wegen ihre Säurefestigkeit lassen sie sich mittels Ziehl-Neelsen-Färbung mikroskopisch von nicht-säurefesten Bakterien unterscheiden [33]. Die mykobakterielle Zellwand ist besonders charakteristisch. Grundsätzlich folgt von innen nach außen auf die Lipiddoppelschicht die Mureinschicht (Peptidoglycan). Mit der Plasmamembran nicht-kovalent assoziiert sind Lipoarabinomannane und Phosphatidylinositolmannoside. Auf die Peptidoglycanschicht folgen Arabinogalactane mit kovalent gebundenen Mykolsäuren. Zwischen den Fettsäureketten der Mykolsäuren sind äußere, extrahierbare Glycolipide eingelagert. Die Lipidschicht wird durch van-der-Waals-Kräfte und der räumliche Nähe von zwei Ketten induzierter Dipole zusammengehalten. Dazu kommt noch die Abstoßung der polaren und apolaren Teile. Die äußeren Glycolipide, Mykolsäuren und Arabinogalactane, Lipoarabinomannan und Phosphatidylinositolmannosid zusammen – also alles außerhalb der Lipiddoppelschicht fasst man als mykobakterielle Zellwand zusammen. Wegen des charakteristischen Aufbaus ihrer Zellwand folgen Mykobakterien der Gram-Differenzierung nur schlecht, werden aber wegen Fehlen einer äußeren Membran den grampositiven Bakterien zugeordnet. Bei der Ziehl-Neelsen-Färbung wird mit Karbol – oder Phenolfuchsin unter Hitze gefärbt, so dass der Farbstoff bei normaler Temperatur auch mit orga-

nischen Lösemitteln und Salzsäure nicht mehr zu entfärben ist [63]. Diese Säurefestigkeit schreibt man der besonders Mycolsäure-haltigen Zellwand zu, die sich bei Mykobakterien aus zwischen 60 und 90 Kohlenstoffatom-langen Fettsäureketten zusammensetzen [58]. Diese hohe Anzahl an C-Atomen ist typisch für Mykobakterien, wohingegen die anderen Vertreter der säurefesten Bakterien wie Corynebakterium und Nocardia lediglich Fettsäureketten bestehend aus 40-60 C-Atomen aufweisen [58]. Die mykobakterielle Zellwand besteht also aus Fettsäureestern, die charakteristisch länger sind als die von anderen Bakterien und einem Glucosamin, das nicht wie bei anderen Bakterien acyliert ist, sondern mit Glycolsäure ein Amid bildet [58] (Hilfestellung Dipl.Ing. Jakob Schilling). Zusätzlich charakteristisch für Mykobakterien ist das Vorkommen von so genannten Phthiocerolen und charakteristisch speziell für *M. tb* und *M. bovis* ist der so genannte Cord-Faktor [58]. Als Cord-Faktor bezeichnet man die Verbindung von Trehalose verestert mit Mycolsäuren. Da je ein Mycolsäurerest mit dem C-6-Atom der beiden Monosaccharide verbunden ist, spricht man auch von Trehalose-6,6-Dimycolat. Diese Eigenschaften machen Mykobakterien besonders hitze-, säure- und antibiotikaresistent [58].

5.2. Bacille Calmette-Guérin und *Mycobacterium bovis*-Stamm AN5

Bacille Calmette-Guérin (BCG) ist nach wie vor der einzige, verfügbare Impfstoff gegen Tuberkulose. Es handelt sich um einen von einem virulenten *Mycobacterium bovis*-Stamm abgeleiteten Lebendimpfstoff. Albert Calmette und Camille Guérin entwickelten diesen Impfstoff zwischen 1908 und 1921 am Pasteur-Institut in Lille bzw. in Paris durch mehrere *in vitro* Passagen [64]. 1928 wurde der Impfstoff vom so genannten Gesundheitsgremium des Völkerbundes akzeptiert. Skandinavien begann mit intradermalen Impfungen in den 1930er Jahren, so dass die Sicherheit des Impfstoffs nach Massenimpfungen gezeigt war, woraufhin BCG in den 1950er Jahren von der WHO zur Verimpfung an Säuglingen und Kinder empfohlen wurde, denn in dieser Patientengruppe zeigte der Impfstoff Effektivität bezüglich Miliartuberkulose und tuberkulöser Meningitis [64–67]. In Erwachsenen aber schützt BCG nicht vor einer Lungentuberkulose und besitzt eine Effektivität zwischen 0 und 80 % [67,68]. Zügig nach der Entwicklung von BCG Pasteur wurde dieser Impfstoffursprungsstamm in mehrere Länder der Erde zur eigenen Impfstoffherstellung versendet. Von Paris innerhalb Europas und bis nach Asien und Nord- und Süd-Amerika. Bis 1961 die Technik der Lyophilisation eingesetzt wurde, war BCG Pasteur bereits 1173 Mal passagiert [67]. BCG Pasteur hat sich durch mehrmaliges Passagieren in den verschiedenen Laboratorien der Welt in unterschiedliche Substämme differenziert [69,70].

Der virulente *Mycobacterium bovis*-Stamm AN5, der als Stamm für heutige Tuberkulinherstellung dient, wurde zuerst 1948 in England isoliert [71]. Moderne gentechnische Analysen haben gezeigt, dass sich die Substämme von BCG, aber auch BCG von anderen Mykobakterienstämmen durch Deletionen in Regionen der DNA unterscheiden („Region of Difference“), deren Produkt typische mykobakterielle Antigene darstellen [40,69,72,73]. Das Fehlen dieser Regionen in BCG hat es - verglichen mit den anderen Vertretern des Tuberculosis-Komplex - attenuiert. 87 % der in diesen Regionen codierten mykobakteriellen Antigene stellen in virulenten Stämmen T-Zell-Epitope dar und deswegen unterscheidet sich BCG und seine Substämme vor allem in diesen Eigenschaften vom virulenten *M.bovis* AN5 [67]. Außerdem unterscheiden sie sich durch Tandemduplikationen und durch Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs). Im Gegensatz zu Deletionen scheinen die Tandemduplikationen keine große Auswirkung auf das Antigenrepertoire von BCG zu haben ebenso wie die Einzelnukleotid-Polymorphismen [68]. BCG als nicht-virulenter Lebendimpfstoff unterscheidet sich im Fehlen der Expression von ein paar prominenten Antigenen, die bei virulenten Mykobakterien exprimiert werden.

Grundsätzlich sind viele bekannte humane T-Zell-Epitope von Mykobakterien des Tuberculosis-Komplex phylogenetisch hochkonserviert [74]. Bei der Untersuchung von 22 mykobakte-

riellen Stämmen des Tuberculosis-Komplex konnte gezeigt werden, dass essentielle Gene stärker konserviert sind als nicht-essentielle. Genauso ist eine Großzahl an T-Zell-Antigenen so hoch konserviert wie die essentiellen Gene. Man geht davon aus, dass einige Epitope für die Immunerkennung des Wirts wichtig sind, um Mykobakterien eine erfolgreiche Infektion sogar zu ermöglichen [74]. Wichtige bisher identifizierte, mykobakterielle Proteinantigene sind unter anderen MPT64, das ein hochspezifisches Antigen für Mykobakterien des Tuberculosis-Komplex darstellt. Es wird sezerniert und ist nur bei einigen Unterstämmen von BCG zu finden, aber bei keinem Vertreter der MOTT-Gruppe (engl. *Mycobacteria other than tuberculosis*) [75]. ESAT-6 (engl. *Early secreted antigenic target*) und CFP-10 (engl. *Culture filtrate protein*) sind Proteinantigene mit einem Molekulargewicht von 6-10 kDa, sind in der RD1-Region codiert und in BCG-Stämmen deletiert, weswegen man sie nur in virulenten Stämmen des Tuberculosis-Komplexes findet. Ein weiterer Proteinkomplex, zusammengesetzt aus drei Varianten, ist der so genannte Ag85-Komplex. Dieser Komplex wird codiert durch drei separate Gene (Ag85A, Ag85B und Ag85C). Die drei Proteine kommen in einem Verhältnis von 2:3:1 vor, wobei Ag85B das höchste Expressionslevel zeigt, Ag85C aber eine achtmal höhere biologische Aktivität aufweist als die beiden anderen Proteine [67,75].

Darüber hinaus exprimieren Mykobakterien wichtige Glycolipidantigene wie Glucosemonomycolat (GMM), Phosphatidylinositol-di-mannosid (PIM₂) und mannosyliertes Lipoarabinomannan (ManLAM). Da es sich dabei allerdings um Strukturen der mykobakteriellen Zellwand handelt, findet man diese Strukturen und deren Derivate sowohl in BCG als auch in virulenten *M.bovis* AN5 [76–79].

5.3. Antigenpräsentationsmoleküle

Der Majorhistokompatibilitätskomplex (MHC – engl. *Major histocompatibility complex*) stellt einen Genabschnitt dar, der für alloreaktive Abstoßungsreaktionen verantwortlich ist, worauf auch die Bezeichnung *Histokompatibilität* basiert. Es ist auch unter der Bezeichnung HLA- (Human-Leukocyte-Antigen)-System oder im Falle von Rindern BoLA- (Bovine-Leukocyte-Antigen)-System bekannt, da diese Moleküle auf den Zelloberflächen die körpereigene Individualität des Immunsystems ausmachen. Das MHC-System ist bei allen Wirbeltieren ab den Knorpelfischen (Chondrichthyes) evolviert. MHC-Gene werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und MHC-Proteine sind im Vergleich zum CD1-Molekül genetisch hoch polymorph. Das CD1-System ist nur in höheren Vertebraten evolviert und codiert eine dritte und gesondert zu betrachtende Familie von antigenpräsentierenden Proteinen auf der Zelloberfläche von Dendritischen Zellen (DCs – engl. *Dendritic cells*).

5.3.1. MHC-Moleküle

Die antigenpräsentierenden Moleküle MHC-I und MHC-II unterscheiden sich in ihrer Proteinstruktur. MHC-I ist ein Heterodimer, bestehend aus einer alpha (α)-Kette und einem beta (β)-2-Mikroglobulin, wobei beide Ketten nicht kovalent miteinander verbunden sind. Die α -Kette ist in drei extrazelluläre Domänen ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), einen Transmembranbereich und einen Abschnitt, der ins Cytoplasma ragt, eingeteilt (Siehe Abbildung 1). Die Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ besitzen Helixstruktur und die $\alpha 3$ -Domäne hat die Struktur eines Immunglobulins. Die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette bilden eine Peptidbindungsgrube. Dabei wird die Bindungsgrube von zwei α -Helices und von einer β -Faltblattstruktur gebildet. So ist ein gebundenes Peptid auf einer Seite frei zugänglich, um vom T-Zell-Rezeptor eines T-Lymphozyten abgetastet und überprüft zu werden. Endogene Antigene sind MHC-I assoziiert. Die Länge der Peptide, die von MHC-I präsentiert werden, beträgt ca. 8-10 Aminosäuren [80].

Das MHC-II-Molekül ist ebenfalls ein Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β -Kette. Verglichen zum MHC-I-Molekül, bei dem nur die α -Kette in der Membran verankert ist, enthalten bei MHC-II-Moleküle sowohl die α - als auch die β -Kette Transmembranregionen (Siehe Abbildung 1). Extrazellulär sind die α - und die β -Ketten in zwei Domänen unterteilt ($\alpha 1$ und $\alpha 2$; $\beta 1$ und $\beta 2$), wobei die $\alpha 1$ - und die $\beta 1$ -Domäne die Bindungsgrube für Antigene bilden. Im Gegensatz zu MHC-I-Molekülen ist bei MHC-II-Molekülen die Bindungsgrube an den Enden offen. Die gebundenen Peptide können daher auf beiden Seiten aus der Bindungsgrube herausragen und haben keine so eng definierte Länge wie im Fall von MHC-I-Liganden. Trotzdem findet man meistens Peptide mit einer Länge von 15-24 Aminosäuren, die von diesen Molekülen gebunden werden. Exogene Antigene sind MHC-II-assoziiert [80].

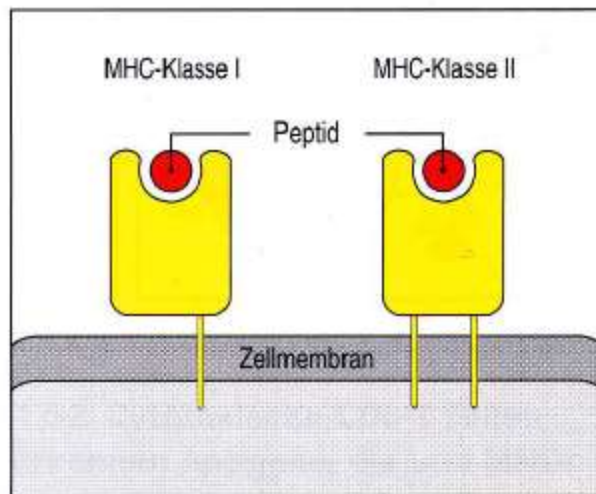


Abbildung 1: Stark vereinfachte Darstellung der MHC-Moleküle [54]

5.3.2. CD1-Moleküle

CD1 Moleküle haben eine ähnliche Struktur wie MHC-I-Moleküle und bestehen aus einer alpha (α)-Kette, die nicht kovalent mit einem beta (β)-2-Mikroglobulin assoziiert ist. Die schwere alpha-Kette besteht dabei aus drei Domänen ($\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$), wobei die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen den apikalen Teil des Moleküls bilden. Die $\alpha 3$ -Domäne dagegen ist membranproximal lokalisiert und mit der $\beta 2$ -Mikroglobulinstruktur assoziiert. Die von der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen gebildete Bindungsgrube ist durch hydrophobe Aminosäuren ausgekleidet, so dass dieses Molekül für die Bindung von apolaren Alkylketten von Lipidantigenen prädestiniert ist [24,78,81].

Man unterscheidet innerhalb des CD1-Systems Gruppe 1- und Gruppe 2-CD1-Moleküle. Zur Gruppe 1 gehören CD1a-, CD1b- und CD1c-Moleküle (Siehe Abbildung 2). Zur Gruppe 2 zählt man das CD1d-Molekül, was hinsichtlich Expressionsmuster eine gesonderte Rolle innerhalb der CD1-Moleküle einnimmt. Innerhalb der Säugetiere weisen Menschen, Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Hasen und Schafe zum Beispiel CD1-Gene auf, allerdings in unterschiedlicher Ausprägung. So trägt das menschliche Genom je ein hochkonserviertes CD1a-, CD1b-, CD1c-, CD1d- und ein CD1e-Gen. Mäuse tragen nur zwei Isoformen des CD1d-Gens, Ratten nur eine Isoform des CD1d-Gens, Meerschweinchen mehr als 5 CD1b-Isoformen und mehr als 3 CD1c-Isoformen und eine CD1e-Isoform. Die meisten Daten und Erkenntnisse über das CD1-Molekül stammen aus dem humanen System [24,76,78].

Beim Menschen werden CD1a-Proteine primär in der Haut und dort auf Langerhans-Zellen exprimiert. CD1b-Proteine findet man vornehmlich auf der Zelloberfläche von dendritischen

Zellen (DCs), wobei die Expression von CD1b auf Monozyten *in vitro* induzierbar ist. CD1c ist auf B-Zellen der Marginalzone von Lymphknoten und im peripheren Blut nachweisbar.

Die Antigenbindungsgrube der CD1-Moleküle unterscheidet sich in ihrem Volumen. Die Bindungsgrube von CD1a-Molekülen beträgt ca. $1,350 \text{ \AA}^3$, die des CD1b-Moleküls ca. 2200 \AA^3 und die des CD1c-Moleküls 1780 \AA^3 [76]. Aufgrund des Fassungsvermögens der Bindungsgruben dieser Moleküle kann man ihnen jeweils eine chemische Strukturfamilie zuordnen, die sie in der Lage sind zu binden und zu präsentieren. So bindet CD1a typischerweise kurzkettige Lipide wie z.B. Mycobactin, CD1b dagegen ist in der Lage Sulfoglycolipide und Mycolipide mit einer Länge von bis zu 80 Kohlenstoff-Atomen zu binden. Mykobakterielle Mycolipide sind die langkettigsten in der Natur vorkommenden linearen Kohlenwasserstoffe, so dass das CD1b-Molekül eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation bei der Immunantwort gegen Mykobakterien zu spielen scheint. Das CD1b-Molekül bindet mykobakterielle Antigene verschiedenster Größe (C12 bis C80 Kohlenwasserstoffketten) und ist damit das flexibelste der CD1-Moleküle, verglichen zu den anderen CD1-Isoformen. Zu den typischen mykobakteriellen Antigenen, die über CD1b präsentiert werden, gehören Glucose-Monomycolat (GMM), Phosphatidylinositol-di-mannosid (PIM_2) und mannosyliertes Lipoarabinomannan (ManLAM), aber auch Glycerol-Monomycolat, freie Mykolsäuren und diacylierte Sulfoglycolipide. Für eine erfolgreiche Beladung des CD1b-Moleküls ist ein abgesenkter pH-Wert im Lysosom erforderlich [23–25,76,78].

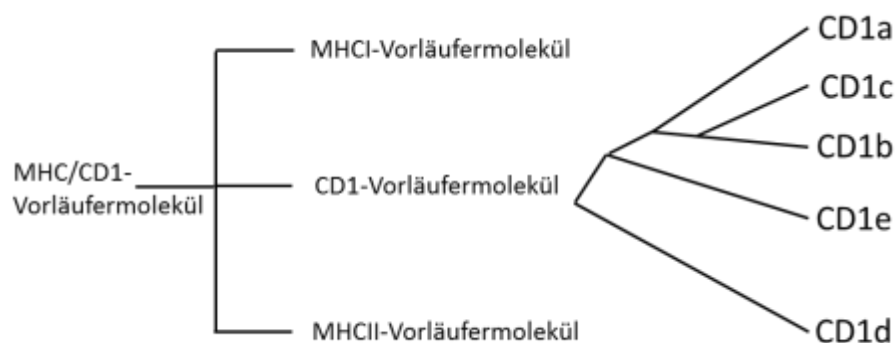


Abbildung 2: Adaptiert nach Porcelli, Modlin, 1999 [24]

5.4. Antigenpräsentationssysteme und T-Zellaktivierung

Zum adaptiven Immunsystem zählen vor allem T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Diese Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie über ihren Antigenrezeptor individuelle Antigene spezifisch erkennen können. Während B-Zellen über den B-Zell-Rezeptor, ihren membranständigen Antikörper, direkt mit Antigenen interagieren können, erkennt der T-Zell-Rezeptor seine Epitope nur im Zusammenhang mit antigenpräsentierenden Molekülen, z.B. MHC-I, MHC-II oder CD1-Molekülen auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (Siehe Abbildung 3). Die in den Organismus gelangten Antigene werden von antigenpräsentierenden Zellen (APCs – engl. *antigen presenting cells*) zunächst phagozytiert, prozessiert und anschließend mittels antigenpräsentierender Moleküle präsentiert. Nach Erkennung der Antigene durch ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor wird eine Signalkaskade zur spezifischen Immunantwort eingeleitet [54].

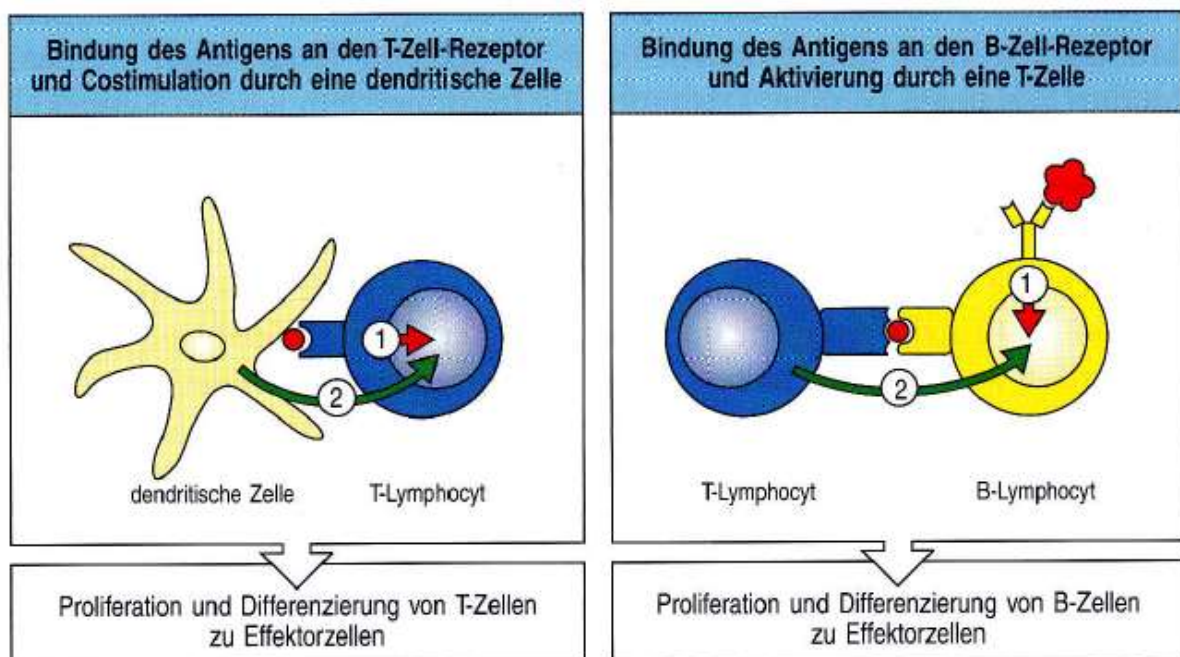


Abbildung 3: Sowohl die Aktivierung von T-Zellen als auch von B-Zellen erfolgt nach Übertragung von zwei Signalen. Signal 1 wird über den Antigenrezeptor des Lymphocyten initiiert. Das zweite Signal erhält der Lymphocyt von einer weiteren Zelle. T-Zellen werden durch antigenpräsentierenden Zellen (z.B. Dendritische Zellen) stimuliert (links); B-Zellen von einer aktivierten T-Zelle. [54]

5.4.1. Antigenprozessierungswege

Schadhafte, körpereigene und körperfremde Moleküle jeglicher Art werden auf verschiedene Weisen metabolisiert und deren Fragmente zur Überprüfung verschiedenen Immunzellen präsentiert. Der Organismus unterliegt somit ständiger Selbstkontrolle auf Zellschäden oder Infektionen. Intrazelluläre Pathogene wie z.B. Viren oder Mykobakterien können sich im Cytoplasma oder in den Vesikeln einer infizierten Zelle aufhalten, sind dort vor löslich im Blutgefäßsystem zirkulierenden Antikörpern geschützt. Das Antigenpräsentationssystem im Zusammenspiel mit der zellvermittelten Immunantwort macht somit intrazellulär metabolisierte Bakterien-, Viren- oder Parasitenbestandteile dem Immunsystem zugänglich und ergänzt so die humorale Immunantwort des Organismus auf Infektionen.

Man unterscheidet zwischen endogenen (cytoplasmatischen) und exogenen (phagozytierten) Antigenen. Endogene Antigene sind diejenigen, die erst in der infizierten Zelle vom Pathogen synthetisiert werden. Exogene Antigene sind diejenigen, die von der infizierten Zelle ins Cytoplasma oder in Vesikeln durch Phagozytose internalisiert wurden. In der Regel (mit Ausnahme des *retrograden Translokationsmechanismus*) werden endogene (cytoplasmatische) Antigene mit MHC-I-Molekülen assoziiert, wogegen exogene (phagozytierte) Antigene MHC-II-assoziiert sind.

Cytoplasmatische Proteine werden mit Hilfe des Proteasoms, einem Enzymkomplex mit zylindrischer Form, bestehend aus 28 Untereinheiten, die in vier aufeinanderliegenden Ringen angeordnet sind, gespalten. Die aktiven Zentren der proteolytischen Untereinheiten liegen im Inneren des Zylinders. Dort werden Proteine zu kurzen Peptiden gespalten und anschließend freigesetzt. Man unterscheidet das konstitutive Proteasom, das in allen Zellen vorkommt und am physiologischen Proteinstoffwechsel beteiligt ist und das so genannte Immunproteasom, das explizit in durch Interferone stimulierten Zellen vorkommt. Zwei Untereinheiten (LMP2 und LMP7) des Immunproteasoms werden im MHC-Genlocus codiert und ersetzen zwei konstitutive Untereinheiten des Proteasoms. Die Expression des Gens einer dritten Untereinheit des Immunproteasoms namens MECL-1, das nicht im MHC liegt, ist ebenso durch Interferone induzierbar. Durch den Austausch der konstitutiven Komponenten gegen interferoninduzierbaren Pendants wird die Spezifität des Proteasoms verändert. Versuche zeigten, dass es in Zellen, die mit Interferon behandelt werden, häufiger zu einer Spaltung von Polypeptiden hinter hydrophoben Resten kommt und die Spaltung hinter sauren Resten herabgesetzt ist [54]. So entstehen Peptide mit Carboxylenden, die bei der Bindung an die meisten MHC-I-Moleküle und beim Transport durch TAP favorisiert werden. Außerdem erhöht sich die Proteinfragmentierungsgeschwindigkeit durch die Modifikation des Proteasoms zum Immunproteasom, um potentielle Antigene vorzeitig vor anderen Prozes-

sierungsmechanismen abzufangen. Die Erhöhung der Fragmentierungsgeschwindigkeit wird durch die Bindung des so genannten PA28-Proteasom-Aktivator-Komplexes an eines oder beide Enden des Proteasomzylinders begünstigt, wobei die Expression der *PA28*-Gene durch IFN γ ausgelöst wird [54]. Die durch das Immunproteasom fragmentierten Peptide werden im Anschluss aktiv vom TAP-Protein in das (engl. *Transporter associated with antigen processing*) in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) der Zelle transportiert (Siehe Abbildung 4). Das TAP-Protein ist ein aus dem TAP1- und dem TAP2-Protein bestehendes Heterodimer. Beide TAP-Proteine gehören zur Familie der ATP-Bindungskassetten-Transporter-Familie. Die Gene *TAP1* und *TAP2* sind im MHC-Genlocus in der Nähe der *LMP2*- und *LMP7*-Gene gelegen und sind durch IFN- γ induzierbar. Der TAP1:TAP2-Komplex transportiert ATP-abhängig präferenziell Peptide mit einer Länge zwischen acht und sechzehn „Aminosäuren mit hydrophoben oder basischen Aminosäureresten am Carboxylende“ [54].

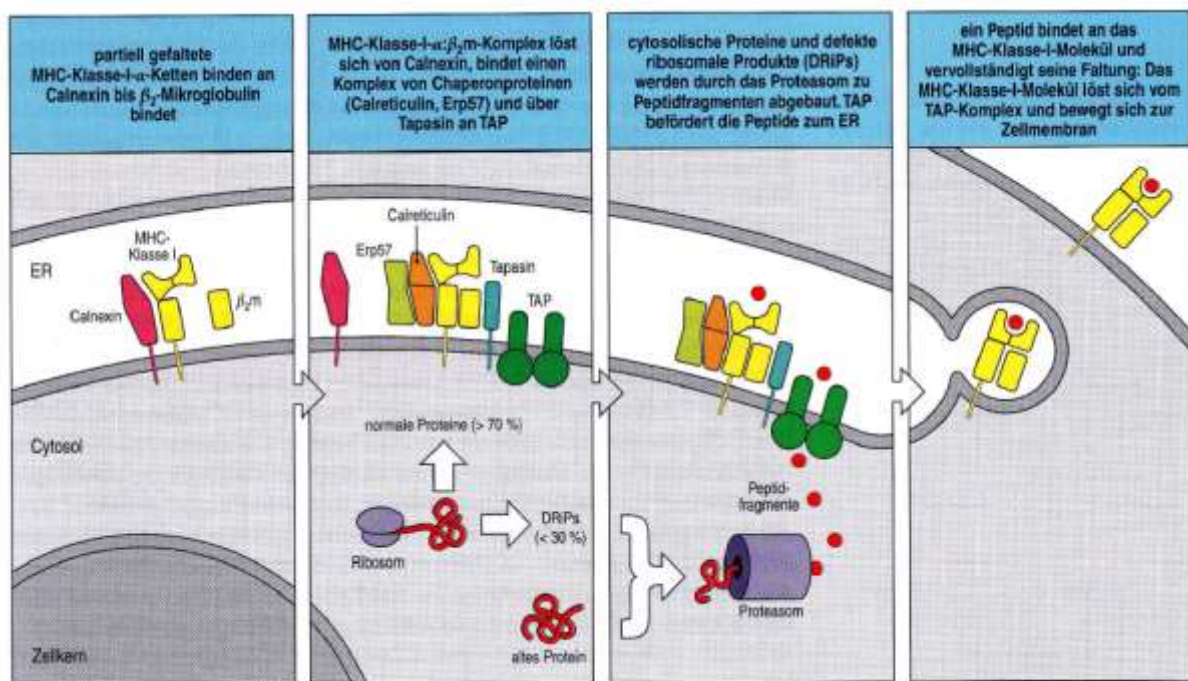


Abbildung 4: Schematische Darstellung der chronologischen Abfolge der Antigenbeladung eines MHC-I-Moleküls. [54]

Das Expressionsniveau des MHC-I-Moleküls ist proportional durch das Vorkommen von cytosolischen Peptidfragmenten und von der Aktivierung durch Zytokine wie IFN γ beeinflusst. MHC-I-Moleküle verbleiben so lange im ER bis sie ein Peptid gebunden haben. Erst dann verlässt dieser Komplex das ER und gelangt zur Zelloberfläche: Bei der Bildung eines stabilen MHC-I-Moleküls mit einem Peptid werden zunächst die α -Kette und die β_2 -Mikroglobulinkette miteinander assoziiert und dann erst folgt die Bindung des Peptids mit

Hilfe von Proteinen mit chaperonähnlicher Funktion, wie z.B. Calnexin, Calreticulin und ERp57. Tapasin bringt das zu noch instabile MHC-I-Molekül in die räumliche Nähe eines Fragmentes, so dass ein Antigen-MHC-I-Komplex entsteht, löst sich vom TAP-Komplex und gelangt zur Zellmembran. Dort können T-Lymphozyten die Zelloberfläche der antigenpräsentierenden Zelle dann abtasten [54].

Pathogene, die durch Phago- oder Pinocytose von extrazellulär in eine Zelle aufgenommen werden, sind in intrazellulären Vesikeln eingeschlossen und deswegen den im Cytosol befindlichen Proteasomen unzugänglich. Diese Vesikel bezeichnet man als Phagosome. Zunächst befindet sich das sogenannte frühe Phagosom in der Zellperipherie, später ist es in der Nähe des Nucleus lokalisiert. Während der Reifung werden Phagosomen durch die Aktivität einer Protonenpumpe, der V-ATPase, angesäuert und fusionieren mit Lysosomen zu sogenannten Phagolysosomen. Die im Lysosom enthaltenen Proteasen werden bei niedrigem pH-Wert aktiviert und spalten die im Phagolysosom enthaltenen Proteine in einzelne Peptidfragmente. Dabei sind hauptsächlich Vertreter der Cysteinproteasen wie Cathepsin B, D, S und L beteiligt [54].

Nach Translation der MHC-II-Moleküle werden sie in das Endoplasmatische Retikulum transloziert. Ähnlich wie beim MHC-I-Molekül ist die spätere Bindungsgrube für Peptidfragmente niemals dem Cytosol zugewandt und ohne Bindung eines Peptids instabil. Die Bindungsgrube des MHC-II-Moleküls wird im ER allerdings von einem Schutzmolekül der so genannten MHC-II-assoziierten invarianten Kette (Ii) abgedeckt. Sie bildet mit einer nicht-kovalenten Bindung je eines MHC-II- α : β -Heterodimers ein Trimer. In Anwesenheit von Calnexin wird der Komplex aus insgesamt neun Ketten im Endoplasmatischen Retikulum zusammen gesetzt und erst gelöst, wenn der Komplex aus dem ER heraustransportiert wird. Eine weitere Funktion der Ii liegt im Lenken des MHC-II-Moleküls aus dem ER in ein endosomales Kompartiment mit niedrigem pH, wo die eigentliche Beladung der MHC-II Bindungsgrube mit dem Peptidliganden erfolgt: Dazu wird zunächst die invariante Kette durch Cathepsin S gespalten. In der Bindungsgrube verbleibt nach einigen Hydrolyseschritten das so genannte CLIP-Fragment (engl. *class-II-associated invariant-chain peptide*). Die Freigabe der Bindungsgrube erfolgt entweder durch Dissoziation oder Verdrängung vornehmlich unter Einwirkung von Cathepsin S (und Cathepsin L in den Epithelzellen des Thymuscortex) in einem spezialisierten vesikulären Kompartiment namens MIIC (MHC-II-Kompartiment; engl. *MHC-II-Compartment*). Ebenso wie beim MHC-I-Molekül sind MHC-II-Moleküle ohne gebundenes Peptid instabil. Dann aggregieren sie im sauren Milieu des endosomalen Kompartiments und werden von Proteasen abgebaut. Eine spezielle MHC-II Isoform, das HLA-DM-Molekül (engl. *human leukocyte antigen DM*), stabilisiert „leere“ MHC-II-Moleküle und kataly-

siert sowohl die Freisetzung des CLIP-Fragments als auch die Bindung eines Peptidliganden. Dabei unterstützt es stabile Peptidbindungen und entfernt lockere bzw. schlecht gebundene Peptide. Das als *Peptide-Editing* bekannte Phänomen verlängert die Halbwertszeit der Peptidbindung in der Bindungsgrube des MHC-II-Moleküls, so dass die Antigenpräsentation an der Zelloberfläche so lange wie möglich anhalten kann [54,80].

Die Beladung des CD1b-Moleküls verläuft ähnlich wie beim MHC-II-Molekül in einem komplexen Prozess, der eine Ansäuerung des Lysosoms und das Zusammenspiel mehrerer akzessorischer Proteine erfordert.

5.4.2. Interaktion mit TCR – T-Zellaktivierung

Während MHC-I-Moleküle immer CD8⁺-T-Lymphozyten, also zytotoxische T-Lymphozyten aktivieren, binden CD4⁺-T-Lymphozyten, also T-Helfer-Zellen nur an antigenpräsentierenden MHC-II-Molekülen. Die Bindung des TCR (engl. *T cell receptor* – *T-Zell-Rezeptor*) von CD8⁺-T-Lymphozyten am antigenpräsentierenden MHC-I-Molekül veranlasst die zytotoxische T-Zelle zur Sekretion von Perforin, Granzymen und Granulysin, was zur Apoptose in der antigenpräsentierenden Zelle (APC) führt. Die Bindung von MHC-II-Molekül der APC und dem TCR der T-Helferzelle führt zur charakteristischen Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interferon-gamma (IFN γ), Interleukin-2 (IL2) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF α). Die Sekretion dieser Zytokine resultiert in der Differenzierung von Makrophagen.

Der TCR besteht aus zwei Polypeptidketten: einer α - und einer β -Kette, die wie beim Fab-Fragment eines Antikörpers durch eine Disulfidbrücke miteinander ein $\alpha\beta$ -Heterodimer bilden. Neben klassischen $\alpha\beta$ -TCR-positiven T-Zellen gibt es Zellen, die einen TCR mit $\gamma\delta$ -Polypeptidketten exprimieren. $\gamma\delta$ -T-Zellen unterscheiden sich in ihren Antigenerkennungseigenschaften fundamental von $\alpha\beta$ -T-Zellen.

Flankierend neben der α - und β -Kette des TCR befinden sich je eine γ - und eine δ -Kette. Je eine ϵ -Ketten benachbart wiederum die γ - und δ -Kette und bilden so das so genannte CD3-Molekül, das spezifisch für alle T-Lymphozyten ist. Damit assoziiert sind je eine ζ -Kette, die ebenso wie die γ -, δ - und die beiden ϵ -Ketten des CD3-Moleküls durch so genannte ITAM-Motive (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) charakterisiert sind. Ein TCR hat verglichen zum Immunglobulin nur eine Antigenbindungsstelle und ist immer membran-gebunden. Homolog zum Immunglobulin besitzt das TCR-Molekül eine aminoterminal variable und eine konstante Region. An dieser konstanten Region hängt ein Cysteinrest, um die Disulfidbrücke zwischen den Ketten bilden zu können. Mit einer hydrophoben Transmembran-anchore sind die Ketten des TCR in der Lipiddoppelschicht verankert und enden auf cytoplasmatischer Seite der T-Zelle. Die Bindung eines Antigens erfolgt an drei Schleifen jeder Kette am variablen aminoterminalen Ende. Diese Schleifen werden *complement determining regions* (CDR) genannt und geben die Antigenspezifität einer T-Zelle vor. Die Variabilität der Bindungsstelle der α -Kette basiert ähnlich wie bei Immunglobulinen auf der genetischen Kombination von V- und J-Segmenten bei der α -Kette und der genetischen Kombination von V-, D- und J-Segmenten bei der β -Kette. Diese so genannte somatische Rekombination auf genetischer Ebene resultiert in einer enormen Vielfalt der Bindungsstellen der TCR. Bei der Bindung eines Antigens unterscheiden sich TCR von Immunglobulinen, in dem sie kurze, lineare Peptidfragmente binden, wogegen Immunglobuline mehrere Aminosäuren - in der Primärstruktur nicht direkt hintereinander liegend - eines nativen, gefalteten Proteins binden.

Außerdem interagiert ein TCR mit einem MHC-Molekül und dem daran gebundenen Antigen einer antigenpräsentierenden Zelle.

Es gibt zwei T-Zell-Corezeptoren, die die T-Lymphozyten in zwei Untergruppen einteilt: Der Besitz eines CD4-Corezeptors zeichnet eine T-Helferzelle aus, wohingegen der CD8-Corezeptor nur auf cytotoxischen T-Zellen vorkommt. Das CD4-Molekül hat eine lineare Struktur, in der vier Immunglobulinähnliche Domänen aneinander gereiht sind und ist mit einer Transmembranregion in der Membran verankert. Das CD8-Molekül ist ein Heterodimer bestehend aus einer α - und β -Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. CD8 interagiert ausschließlich mit dem Peptid:MHC-I-Komplex, während CD4 nur mit einem MHC-II-Molekül und dessen entsprechend gebundenen Peptidantigenen interagiert. Bei der Erkennung eines Antigens interagieren diese Corezeptoren mit dem TCR und binden räumlich entfernt von der Peptidbindungsstelle an konstanten Regionen des MHC-Teils des Peptid:MHC-Komplex. Diese Bindung ist für eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung unabdingbar.

Die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Peptid:MHC-I-Komplex und die gleichzeitige Bindung vom Corezeptor CD8 der T-Zelle an das MHC-Molekül resultiert in der Phosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb der ITAM-Sequenzen durch Lck, einer Tyrosin-Kinase. So entstehen Bindungsstellen für die Proteinkinase ZAP70. ZAP70 phosphoryliert mit Hilfe von Molekülen wie CD45 und CD28 weitere Zielproteine, so dass eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird. Die noch naive T-Zelle ist aktiviert, sobald sie in geeigneter Weise mit ihrem passenden Antigen stimuliert wird und beginnt sich zu teilen. Anschließend differenzieren sich der Art stimulierte T-Zellen zu T-Effektorzellen und sind als solche in der Lage cytotoxische Aktivität zu entwickeln. Auf diese Weise entstehen mehrere T-Zellen mit dem gleichen T-Zell-Rezeptor, so dass weitere mit dem selben Pathogen mit seinen Antigenen befallene Zellen eliminiert werden können. Im Falle von T-Helferzellen erfolgt die T-Zell-Aktivierung ebenso über die Phosphorylierungskaskade durch Lck und ZAP70, resultiert allerdings nicht in der Apoptose der Zielzelle, sondern in der Sekretion verschiedener Zytokine, wie Interleukin-2 (IL2) und Interferon- γ (IFN γ). Diese binden wiederum an spezifische Rezeptoren der antigenpräsentierenden Zelle und stimulieren diese zu Wachstum und Differenzierung [80].

5.5. Die Primärinfektion mit Mykobakterien

Die Infektion mit Mykobakterien des Tuberkulosekomplexes erfolgt in der Regel über die Atemwege. Sowohl in der Lunge des Menschen als auch beim Rind infizieren sie die Alveolarmakrophagen bzw. werden von Alveolarmakrophagen phagozytiert und intrazellulär prozessiert. Mykobakterien sind allerdings in der Lage diese intrazelluläre Prozessierung, wie die Ansäuerung des Phagosoms und die Reifung zum Phagolysosom in den Makrophagen zu verzögern [82]. Potentielle, mykobakterielle Antigene werden von Dendritischen Zellen (DCs) zum drainierenden Lymphknoten transportiert. Im Lymphknoten werden antigenspezifische T-Zellen aktiviert. Diese migrieren zurück zum Infektionsherd und verursachen dort mittels IFN γ - und TNF α -Sekretion eine lokale Entzündung. Alveolarmakrophagen und Epithelzellen der Lunge sezernieren derweil IL-8, um neutrophile Granulozyten zu rekrutieren. Granulozyten und Monozyten, die sich dort zu Makrophagen differenzieren, wandern zur Infektionsstelle und wirken an der Eindämmung der Infektion mit. Makrophagen stellen die Hauptzellpopulation im Granulomgebilde dar. Sie exprimieren viele Rezeptoren für Signalwege des angeborenen Immunsystems. Beteiligt an der Granulombildung sind unter vielen anderen hauptsächlich NOD2, Komplementrezeptoren, der Mannoserezeptor, TLR2, TLR4, und TLR9. Die Sekretion von IFN γ aktiviert weitere Makrophagen und induziert die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO). Die Stickstoffmonoxidproduktion dient der Tötung der Bakterien, in dem es infizierte Makrophagen damit in Apoptose schickt. Unter Einwirkung der IFN γ -sezernierenden T_{H1}-Zellen entsteht das so genannte Granulom, das im Zentrum aus nekrotischen Zellen besteht und hypoxisch ist. In dieser sauerstoffarmen Umgebung finden sich keine lebenden Wirtszellen mehr, aber lebende Mykobakterien, die sich dort in der so genannten latenten Phase befinden. Dieser Bereich wird von so genannten Langerhans'schen Riesenzellen umschlossen, die wiederum von Lymphozyten und Gewebsmakrophagen eingehüllt werden. Ein Granulom kann über viele Jahre in der Lunge existieren. Dabei unterliegt es aber dem permanenten Wandel, denn die äußere Hülle des Granuloms erneuert bzw. verändert sich dahingehend, dass Lymphozyten und Monozyten permanent neu einwandern, dort apoptotisch werden und ersetzt werden müssen. So gelangen auch Mykobakterien aus dem Zentrum des Granuloms in die Peripherie und werden dort von zytotoxischen T-Zellen oder Makrophagen eliminiert. Gerät dieses immunologische Wechselspiel aus dem Gleichgewicht, wie zum Beispiel durch eine alters- oder ernährungsbedingte Immunsuppression oder einer HIV-Infektion, bricht das Granulom auf und Mykobakterien erreichen die oberen Atemwege des Wirts, der diese aerosolisch durch Husten auf das nächste Individuum übertragen kann.

6. Material und Methoden

6.1. Der Tuberkulin-Hauttest

Der Tuberkulin-Hauttest (TST) wurde mit Abweichungen von der Monografie 01/2008 aus dem Europäischen Arzneibuch „Chargenprüfung von bovinem Tuberculin“ durchgeführt. Bei den Abweichungen handelte es sich um die Tieranzahl je Gruppe bei den Experimenten und um die Sensibilisierungsstrategie. In dieser Arbeit wurde bewusst mit nicht-infektiösem, mykobakteriellen Material gearbeitet, obwohl die Monografie für die benötigte Sensibilisierung der Tiere eine Infektion mit virulenten *Mycobacterium bovis*-Bakterien vorschreibt. Der TST wurde in drei Versuchstage aufgeteilt. Zu Versuchsbeginn an Tag 0 wurden die Versuchstiere sensibilisiert, an Tag 30 erfolgte die Tuberkulinisierung und an Tag 31 wurden die Versuchsergebnisse ausgelesen.

6.1.1. Sensibilisierung der Meerschweinchen an Tag 0

Naive, weibliche Dunkin-Hartley Meerschweinchen von Charles River (10-15 pro Gruppe; >700-800 g Körpergewicht) wurden entweder mit dem attenuierten Lebendimpfstoff BCG oder mit hitze-inaktivierter Feuchtmasse des *Mycobacterium bovis* - Stamms AN5 (iAN5) sensibilisiert. Diejenigen Versuchstiere, die mit iAN5 sensibilisiert wurden, erhielten dafür eine Anästhesie mit einer Dosis von 0,5 mL/kg Körpergewicht Ketamin/Xylazin (10 mL Ur-sotamin® (100 mg/mL – Serumwerk Bernburg AG) und 1,1 mL Rompun® TS (50 mg/mL - Bayer)) subkutan in die Nackenfalte. Das entspricht 45 mg Ketamin und 2,5 mg Xylazin pro Kilogramm Körpergewicht eines Meerschweinchens. Diejenigen Versuchstiere, die mit BCG geimpft wurden, erhielten während der Sensibilisierung keine Narkose.

Attenuierter Lebendimpfstoff BCG (*Bacille Calmette-Guérin*)

Lyophilisiertes BCG-MEDAC (BCG Pasteur Stamm 1173) wurde in einer Bakterienkonzentration von 2×10^5 - 3×10^6 Bakterien/mL in PBS (Phosphate buffered saline) (PEI) resuspendiert. Jedes Tier erhielt eine subkutane Injektion in die linke Flanke mit einem Injektionsvolumen von 0,5 mL.

Hitze-inaktivierte Feuchtmasse des *M. bovis*-Stamms AN5 (iAN5)

Inaktivierte mykobakterielle Feuchtmasse (iAN5) wurde mittels Feinwaage eingewogen und in Paraffin (4 mg/mL Paraffin-Öl (liquid (Merck, 1.07162.1000)), das im Wasserbad auf einer Heizplatte auf 95° C erwärmt wurde, homogen resuspendiert. Unter Anästhesie erhielt jedes Tier zwei Injektionen mit je einem Injektionsvolumen von 0,25 mL intramuskulär in die ischio-crurale Muskulatur beider Hinterläufe.

6.1.2. Tuberkulinisierung der Meerschweinchen an Tag 30

Um die Tuberkulinisierung vorzubereiten wurden das Testtuberkulin und das bovine WHO-Referenztuberkulin frisch angesetzt: Das bovine WHO-Tuberkulin wurde als Lyophilisat geliefert und in 5 mL PBS (PEI) resuspendiert, so dass die Stockkonzentration bei 11700 IE/mL lag. Die Testtuberkuline unterschieden sich in der vom Hersteller angegebenen Konzentration und wurden ebenso wie das bovine WHO-Tuberkulin auf drei Konzentrationen von 509 IE/mL, 169 IE/mL und 56 IE/mL in PBS/Tween₈₀® verdünnt.

Für die Tuberkulinisierung wurden die Meerschweinchen zunächst mit 0,5 mL/kg Körpergewicht Ketamin/Xylazin (10 mL Ursotamin® (100 mg/mL – Serumwerk Bernburg AG) und 1,1 mL Rompun® TS (50 mg/mL - Bayer)) subkutan in die Nackenfalte anästhesiert. Die Flanken der Meerschweinchen wurden mit einem elektrischen Rasierer aus dem Veterinärgebrauch sorgfältig enthaart. Mit dem Deckelrand eines 50 mL-Falcon-Röhrchens und einem Stempelkissen wurden je sechs schwarze Kreise je rasierter Flanke der Meerschweinchen gestempelt, um Felder für die Tuberkulininjektionsstellen vorzugeben. Jedes Tier erhielt dabei pro Körperseite sowohl das Referenz- als auch das Testtuberkulin intradermal, so dass jede Konzentration beider Tuberkuline zweimal je Tier injiziert wurde. In toto erhielt jedes Tier pro Tuberkulinisierung 12 intradermale Injektionen mit einem Injektionsvolumen von 0,1 mL. Je rasierter Flanke bekam jedes Tier drei Injektionen in zwei Reihen. Bei der intrakutanen Injektion war darauf zu achten, dass kein Tropfen aus der Injektionsstelle hervortrat, sobald die Kanüle zurückgezogen wurde. Um systematische Injektionsfehler zu vermeiden, wurden die Injektionen unter Berücksichtigung des lateinischen Quadrats entsprechend der Arzneibuchmonografie 01/2008 gesetzt.

6.1.3. Auslesen der Hautläsionen an Tag 31

Nach 24 h wurden die Durchmesser der durch Tuberkulinisierung entstandenen Hautläsionen mit einem Lineal abgemessen. Dazu wurde jedes Tier mit einer leichteren Dosis (0,25 mL/kg Körpergewicht) gerade so weit sediert, dass es sich auf die Seite legen ließ. Der Durchmesser jeder Läsion wurde von zwei Personen einmal horizontal und einmal vertikal abgemessen, so dass pro Läsion vier Werte in Millimeter erhoben wurden, die später bei statistischer Auswertung gemittelt werden konnten. Zusätzlich wurde jede Flanke jedes Tieres fotografiert, um die Größe der Hautläsionen digital ermitteln zu können (Siehe Abbildung 5).

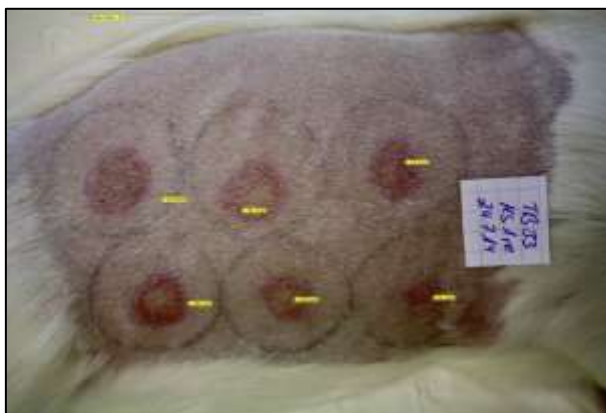


Abbildung 5: Hautläsionen 24 h nach Tuberkulinisierung des Meerschweinchens

6.1.4. Statistische Analyse des Tuberkulin-Hauttests

Nach Datenerhebung mittels Linealvermessung der Durchmesser der Hautläsionen wurden die vier Werte der Duplikate aller drei Konzentrationen verwendet, um die Wirkstärke des Testtuberkulins mit Hilfe der CombiStats-Software (EDQM) im Vergleich zum bovinen WHO-Referenztuberkulin zu ermitteln. Die Wirkstärkenermittlung erfolgte hier durch Regressionsanalyse unter Anwendung des Parallel-Line-Assays zunächst für jedes Tier einzeln und später kombiniert für die gesamte Versuchsgruppe [83].

6.2. Der ex vivo T ϕ -Proliferations-Assay

Der T ϕ -Proliferations-Assay wurde in drei Versuchstage aufgeteilt. An Tag 0 wurden die Meerschweinchen sensibilisiert, an Tag 30 wurde Blut entnommen, aufbereitet und der Test angesetzt, so dass an Tag 35 die Analyse der mit Tuberkulin stimulierten Zellen am Durchflussszytometer durchgeführt werden konnte. Beim T ϕ -Proliferations-Assay wurde bewusst auf die Nutzung infektiösen Materials verzichtet. Während der Etablierungsphase wurden Experimente hinsichtlich der Kulturbedingungen für Meerschweinchen-PBMCs (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) gemacht, die dahingehend erfolgreich waren, dass die Verwendung von SF-IMDM als Medium und autologem Serum und Brutschrankbedingungen von 37° C und 5,5 % CO₂ eine optimale Assayqualität erzeugten. Fünf Tage Kultivierungsdauer stellten sich als minimales Zeitfenster für optimale Messbarkeit der proliferierten Zellen heraus, wobei eine Ausdehnung auf sechs Tage problemlos ist.

6.2.1. Sensibilisierung der Meerschweinchen an Tag 0

Die Sensibilisierung der Meerschweinchen erfolgte wie in Abschnitt 6.1.1 beschrieben.

6.3. Blutentnahme und T ϕ -Proliferations-Assay an Tag 30

Für die Blutentnahme wurden die Meerschweinchen wie in Abschnitt 6.1.2 bereits beschrieben mit 0,5 mL/kg Körpergewicht Ketamin/Xylazin (10 mL Ursotamin® (100 mg/mL – Serumwerk Bernburg AG) und 1,1 mL Rompun® TS (50 mg/mL - Bayer)) subkutan in die Nackenfalte anästhesiert. Mit 10 mL-Spritzen, in denen zuvor >1 mL Tri-Natrium-Citrat (0,1 M) (Carl Roth GmbH) steril unter der Sicherheitswerkbank vorgelegt wurden, wurden jedem Meerschweinchen mittels nicht-finaler Herzpunktion maximal 20 % des minimal zu erwartenden Gesamtblutvolumens entnommen. Durch extrem ruhiges und vorsichtiges Wechseln der Citratblutspritze zu einer leeren 5 mL-Spritze ließen sich weitere 2 mL Serumblut entnehmen, so dass nur einmal punktiert werden musste. Das Serumblut wurde in Serumröhrchen (greiner bio-one) überführt. Die Meerschweinchen wurden sofort auf die rechte Seite gelegt, um das Herz zu entlasten und über die Dauer der Narkose entsprechend versorgt und kontrolliert.

Das Citratblut wurde steril in der Sicherheitswerkbank aus den Spritzen in ein 50 mL-Falcon-Gefäß überführt und im Verhältnis 1:1 mit PBS (PEI) gemischt. Dieses Blut-PBS-Gemisch wurde behutsam auf 15 mL vorgelegtes, raumtemperiertes Ficoll (GE Healthcare - 17-1440-02) gegeben und anschließend für 45 min bei 2190 x g ohne Bremse zentrifugiert, um Lymphozyten von Erythrozyten und Granulozyten zu trennen. Nach Abnehmen des Lymphozytent Teppichs vom Ficoll wurden die so erhaltenen PBMCs 2x mit PBS bei 2320 x g für 5 min gewaschen. Um das Zellpellet von Thrombozyten zu befreien, wurde ein dritter und langsamerer Zentrifugationsschritt bei 770 x g für 7 min angeschlossen. Die PBMCs wurden in 1 mL PBS resuspendiert und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Für die CFSE (Carboxyfluoresceinsuccinimidylester)-Färbung (BioLegend) wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^7 /mL PBS eingestellt, das Wasserbad auf 37° C temperiert und mit 20 μ L einer 5 μ M CFSE/PBS-Lösung für 14 min im Wasserbad gefärbt. Der Färbeprozess der PBMCs wurde mit 2 mL PBS/1% FCS abgestoppt, die Zellen zweimal bei 2320 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Während des gesamten Assays war unbedingt darauf zu achten, dass die PBMCs vor der CFSE-Färbung nur mit PBS behandelt und erst nach der Färbung mit PBS/1% FCS gewaschen wurden. Danach wurden die PBMCs auf 2×10^6 Zellen/mL eingestellt, in dem sie in SF-IMDM (PEI) und 10 % autologem Meerschweinchen Serum aufgenommen wurden. Das Serum wurde für 5 min in den Serumröhrchen bei 4090 x g zentrifugiert, um feste von flüssigen Blutbestandteilen zu trennen. Die PBMCs waren nun bereit für die Plattenbelegung.

Indes wurden 96-Well-Rundbodenplatten (nunc) mit den Tuberkulinen wie folgend beschrieben vorbereitet: Um Verdunstungserscheinungen über die Kultivierungsdauer gering zu halten, wurden die Randkavitäten mit 100 µL je Kavität sterilem Reinstwasser (PEI) befüllt. Alle Testansätze wurden in Duplikaten angelegt. Die Zellausbeute reichte für das Mitführen von einer Negativkontrolle (Medium), einer Positivkontrolle (0,25 µg/mL PHA) und für das parallele Testen von zwei Chargen und dem bovinen WHO-Referenztuberkulin aus. Die höchste zu testende Konzentration der Tuberkuline *in vitro* wurde nach Titrationsversuchen auf 30 IE/mL festgelegt. Um diese Konzentration zu erreichen, wurde eine Gebrauchslösung mit 60 IE/mL angesetzt und damit 75 µL mit 4,5 IE je Kavität vorgelegt. Um die Verdünnungsreihe in 1:3-Schritten fortzusetzen, wurden in den darunterliegenden Kavitäten 50 µL Medium vorgelegt. Durch Resuspendieren und Aufnahme von 25 µL aus der ersten Kavität und Weiterverdünnen in die fortfolgenden Kavitäten, wurden die Tuberkuline demnach in einer Reihe beginnend von 30 IE/mL über 10 IE/mL abwärts über 3 IE/mL und 1 IE/mL bis zu 0,01 IE/mL verdünnt, so dass insgesamt acht Konzentrationen in einer Reihe in Duplikaten getestet werden konnten (Siehe Pipettier- und Plattenbelegungsschema in Abbildung 6). Nun lagen je Kavität und Tuberkulinreihen 50 µL-Ansätze vor. Indem die vorbereitete PBMC-Suspension in 50 µL-Volumina nun hinzu pipettiert werden konnten, resultierten Kultivierungsbedingungen von 1×10^5 Zellen/Kavität in Duplikaten in acht verschiedenen Tuberkulinkonzentrationen beginnend bei 30 IE/mL bis hinab zu 0.01 IE/mL in SF-IMDM und 5 % autologem Serum. Diese Ansätze wurden für mindestens fünf Tage (optional auch sechs Tage) bei 5 % CO₂ und 37° C im Brutschrank kultiviert.

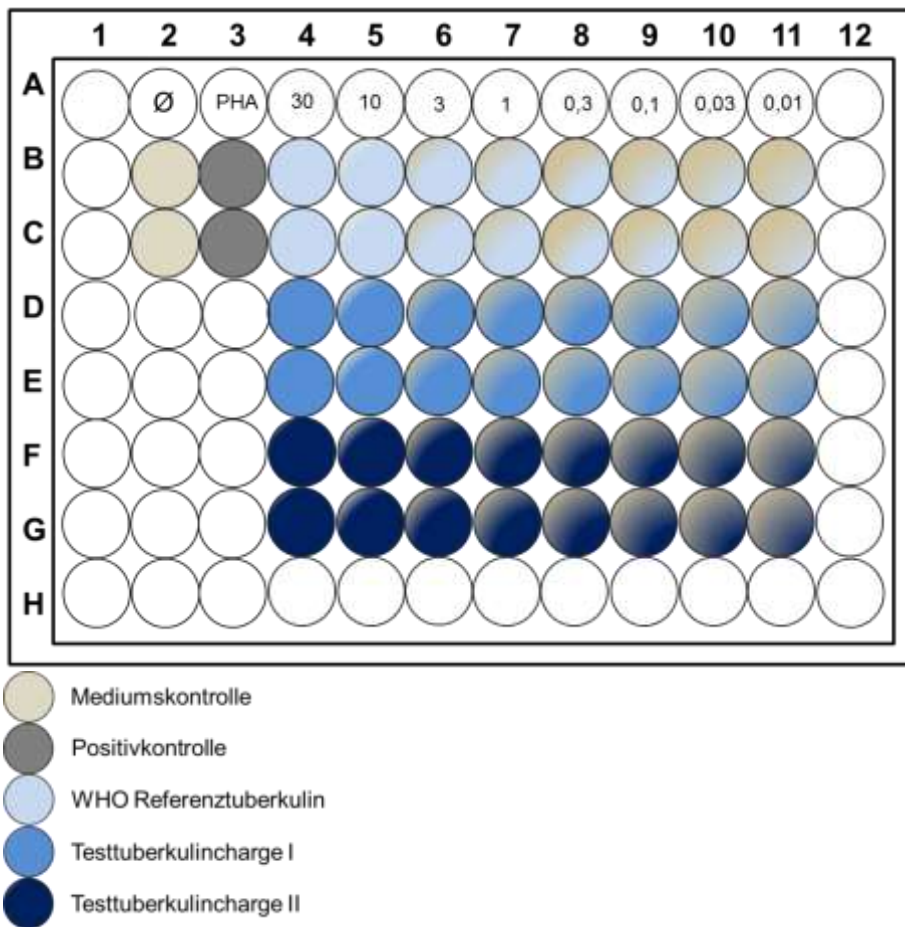


Abbildung 6: Plattenbelegungsschema beim *ex vivo* T ϕ -Proliferations-Assay (Reihe A2-A11 beschriften die Verdünnungsreihe der Tuberkulin in IE/mL)

6.3.1. Durchflusszytometrische Analyse an Tag 35

Nach fünf Tagen wurden die Zellen gut resuspendiert und im Durchflusszytometer (FACS) vermessen. Anhand der Forward Scatter (FSC)-Side Scatter (SSC)-Charakteristika wurde die lebende Lymphozytenpopulation definiert. Daraufhin wurden die Zellen hinsichtlich ihrer grünen Fluoreszenzintensität betrachtet (FL1-Kanal/FSC-Plot). Die Negativkontrolle musste dabei eine einzige stark grün fluoreszierende Population und die Positivkontrolle eine zusätzliche, zweite nach links in Richtung fluoreszenzschwacher Seite der Abszisse ausschwärmenden Population zeigen. Anhand der CFSE-Fluoreszenz wurde ein fluoreszenzschwacher Bereich definiert, um all diejenigen Zellen zu ermitteln, die von der Hauptpopulation (starke Fluoreszenz) separiert, proliferiert waren und somit CFSE mit jeder Zellteilung um die Hälfte der Intensität verlieren. Mittels BD Accuri™ C6-Software konnten so Prozentanteile der proliferierten Zellen von der Ausgangspopulation ermittelt werden, wobei das Experiment als valide galt, wenn die Positivkontrolle Proliferation über die 20 %-Grenze hinaus induzierte und die Negativkontrolle unterhalb von 10 % proliferierter Zellen lag.

6.4. Statistische Analyse des ex vivo T ϕ -Proliferations-Assay

Nach Datenerhebung der CFSE-schwach fluoreszierenden Population wurden die Werte der Duplikate aller Konzentrationen verwendet, um die Potenz des Testtuberkulins bzw. beider getesteten Testtuberkuline in Beziehung zum WHO bovinen Referenztuberkulin mittels CombiStats-Software zu ermitteln. Die Potenzermittlung folgte durch Regressionsanalyse im sigmoiden Kurvenmodell zunächst für jedes Tier einzeln und später kombiniert für die gesamte Tiergruppe. An die Messwerte (prozentuale Fluoreszenz je logarithmierte Verdünnungsstufe) jedes Tieres wurde hierbei eine vierparametrische, sigmoide Dosis-Wirkungskurve angepasst. Ein kombinierter Schätzer für die Wirkstärke wurde je nach Homogenität der Einzelschätzer als ungewichteter oder gewichteter Wert berechnet [83].

Mittels t-Test wurden statistische Signifikanzen von Unterschieden berechnet und unter Nutzung des nicht-parametrischen Spearman-Korrelationstest unter Annahme einer nicht-Gaußschen Verteilung der Wirksamkeitsschätzwerte wurden die Korrelationskoeffizienten berechnet. Um die Reproduzierbarkeit (Inter-Assay-Präzision bzw. Wiederfindung) zu überprüfen, wurde der geometrische Variationskoeffizient über vier Versuche (drei Wiederholungen mit demselben Präparat) ermittelt. Beim geometrischen Variationskoeffizienten handelt es sich um einen Prozentwert, der nach der Formel $CV = \sqrt{e^{\sigma_{\ln}^2} - 1}$ berechnet wird, wobei σ_{\ln}^2 die quadrierte Standardabweichung über die zuvor natürlich logarithmierten Mittelwerte darstellt.

Ebenso wurde die Intra-Assay-Präzision mittels Variationskoeffizient verglichen, um zu klären, ob innerhalb aller T ϕ -Proliferations-Assays, die in dieser Studie durchgeführt wurden, die Varianz höher/niedriger war verglichen zu den durchgeführten TST (Siehe 7.2.6). (Hilfe von Kay-Martin Hanschmann aus der Biostatistik des Paul-Ehrlich-Instituts).

6.5. gpTNF α -ELISA zur Untermauerung des *ex vivo* Proliferationsassays

Bei der Etablierung einer neuen Methode war zu zeigen, dass der zu messende Endpunkt adäquat gewählt wurde. Bei dem in dieser Arbeit etablierten T ϕ -Proliferations-Assay dienen antigenspezifische T-Zellen als Endpunkt für eine Wirkstärkenmessung. Da es sich bei dieser T-Zell-Antwort auf Tuberkuline um eine immunologisch auf einer Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ basierenden Reaktion handelt, sollte diese Antwort auch mittels Zytokinmessung detektierbar sein. Zur Untermauerung des *ex vivo* T ϕ -Proliferations-Assays wurde ein gpTNF α -ELISA zur Quantifizierung des inflammatorischen und an der Hypersensitivitätsreaktion beteiligten Zytokins TNF α angeschlossen.

Der *ex vivo* T ϕ -Proliferations-Assay wurde zu diesem Zwecke so angesetzt, dass 24 h nach Versuchsansatz 50 μ L Überstände entnommen werden konnten, um diese Überstände mittels kommerziell erwerblichen gpTNF α -ELISA (Kingfisher Biotech, Inc.) auf TNF α -Sekretion zu untersuchen. Dazu wurde eine ELISA-Platte im 96-Well-Format (MaxiSorb, nunc) mit 50 μ L anti-gpTNF α -Antikörper in PBS (1 μ g/mL) je Kavität über Nacht bei Raumtemperatur benetzt. Am nächsten Morgen wurde die Platte ausgeschlagen und 200 μ L PBS/0,05 % Tween₂₀/4 % BSA für 1 h bei Raumtemperatur zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen in die jeweiligen Kavitäten gegeben. Anschließend wurde die Platte erneut ausgeschlagen und der gpTNF α -Standard und die genommenen Überstände in gewünschter Verdünnung hinzugegeben. Die Proben inkubierten 2 h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Kavitäten auf ein Tuch ausgeschlagen und die Platte 3x mit 100 μ L PBS/Tween₂₀ (PEI) gewaschen und entsprechend wieder ausgeschlagen. Daraufhin wurde der anti-gpTNF α ^{Biotin}-Detektionsantikörper in einer Konzentration von 0,1 μ g/mL in PBS/Tween₂₀ zu je 50 μ L je Kavität hinzu gegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend folgte dreimaliges Waschen mit PBS/Tween₂₀ wie oben bereits erläutert. Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin (DIANOVA) wurde mit 0,1 μ g/mL je Kavität zu 100 μ L in die entsprechenden Kavitäten gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte ein dreimaliger Waschschrift wie zuvor beschrieben. Die Entwicklung des ELISA erfolgte für 5 min mittels 50 μ L TMB-Substrat-Gebrauchslösung und wurde anschließend mit 50 μ L H₂SO₄ (1 M) je Kavität abgestoppt und im ELISA-Reader (Tecan) bei 450 nm/620 nm ausgelesen. Das TMB-Substrat wurde kurz vor Benutzung frisch angesetzt und vor Licht geschützt. TMB (Sigma) wurde in einer Konzentration von 6 mg/mL in 96 % Ethanol gelöst, wobei es bis zu 3 min gevortext werden muss (TMB-Stammlösung). Für die Gebrauchslösung legte man 9 mL Aq.Dest (PEI) in ein 15 mL Falconröhrchen vor, gab 1 mL einer 1 M Natriumacetatlösung (pH 5,5) (PEI) hinzu, pipettierte 2 μ L Wasserstoffperoxid (Merck) dazu und fügte zum Schluss 167 μ L von der zuvor angesetzten TMB-Stammlösung bei.

6.6. Klonierung von Meerschweinchenzytokinen (gpZytokine)

Aufgrund kommerziell mangelnder Verfügbarkeit molekularbiologischer Reagenzien für die Beantwortung immunologischer Fragestellungen im Meerschweinchenmodell mussten für die vorgelegte Arbeit zunächst vier Meerschweinchenzytokine rekombinant exprimiert werden. Für das Parallelprojekt wurden Meerschweinchen-Interferon-gamma und Meerschweinchen-Interleukin-2 exprimiert. Für das in dieser Dissertation geschriebene Projekt wurde die rekombinante Expression für Meerschweinchen-Interleukin-4 (gpIL4) und Meerschweinchen-Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (gpGM-CSF) benötigt und werden nun im Folgenden dargestellt.

6.6.1. RNA-Isolation aus Meerschweinchen-PBMCs (gpPBMCs)

Für die RNA-Isolation aus Meerschweinchenzellen wurden Meerschweinchen unter Narkose wie in Abschnitt 6.1.2 beschrieben Blut entnommen und PBMCs mittels Ficollgradientenzentrifugation aufgereinigt. Mittels RNeasy® Mini Kit 50 (Cat.No.: 74104) von Qiagen wurde die benötigte Meerschweinchen-RNA (gpRNA) aus den mit PHA behandelten PBMCs isoliert.

6.6.2. Reverse Transkriptase-PCR

In einem anschließenden RT-PCR-Schritt wurde die gpRNA mittels oligo-dT-Primer und Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben. Dafür wurde für jedes der Zielzytokine ein PCR-Ansatz, wie in Tabelle 1 aufgelistet, auf Eis angesetzt. Anschließend folgte die Reverse-Transkriptase-PCR im Thermozykler nach dem in Tabelle 2 beschriebenen Schema. Der Mastermix wurde erst nach der Denaturierung auf Eis zur Probe gegeben.

Tabelle 1: Ansatz der RT-PCR

RT-PCR-Ansatz (NEB)	1-fach
10xPuffer II	5 µl
MgCl ₂ (25mM)	4 µl
dNTP Mix (10mM)	4 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
Reverse Transkriptase	1.0 µl
Gesamt:	10 µl

Tabelle 2: PCR-Bedingungen für den Thermozykler während der RT-PCR

Cyclerprogramm RT	t	T°	Zyklen
Denaturierung	10 min	70°C	
direkt auf Eis stellen	10 µl Mastermix hinzugeben		
RT	60 min	43°C	

6.6.3. PCR

Die anschließende PCR für die jeweiligen gpZytokine wurde mit folgenden Primern von ThermoFisher (Ulm) durchgeführt:

Tabelle 3: Basensequenzen der forward- und reverse-Primer, die für die anschließende Klonierungs-PCR genutzt wurden.

Primername	Sequenz	Annealing Temperatur in °C	Größe des PCR-Produkts
gpGM-CSF for	<u>ggatcc</u> gccaccatgtggctgcagaacctg	52	420 bp
gpGM-CSF rev	tcattcctgcaccggttccagcagtcaaaaggg	50	438 bp
gpIL4 for	<u>ggatcc</u> gccaccatgggtctggtgcc	50	440 bp
gpIL4 rev	<u>ctcgagt</u> tagcgtctacacttgaa	52	

Mit den in Tabelle 3 dargestellten Primern wurde eine PCR nach dem in Tabelle 4 und Tabelle 5 dargestellten Schema durchgeführt:

(10 µl c-DNA + 15 µl Mastermix)

Tabelle 4: PCR-Ansätze für die Meerschweinchenzytokine gpGM-CSF und gpIL4

PCR Ansatz	Mastermix	gpGM-CSF	gpIL4
DEPC-H ₂ O	28.0 µl	7.0 µl	7.0 µl
10xPuffer II	10.0 µl	2.5 µl	2.5 µl
MgCl ₂ (25mM)	8.0 µl	2.0 µl	2.0 µl
dNTP Mix (2 mM je)	10.0 µl	2.5 µl	2.5 µl
Taq Gold	2.0 µl	0.5 µl	0.5 µl
Primer (25 µM je)	–	0.5 µl	0.5 µl
Gesamt:	58 µl	15 µl	15 µl

Tabelle 5: Thermozyklerprogramm mit Hilfe dessen die zwei Zytokine anhand der cDNA mittels ihrer Primer verfielfältigt wurden.

	t	T°	Zyklen
Denaturierung	2 min	95°C	42 x
Denaturierung	30 sec	95°C	
Annealing	30 sec	48°C	
Elongation	45 sec	72°C	
Elongation	10 min	72°C	
Aufbewahrung	∞	4°C	

Nach der PCR wurden die jeweiligen PCR-Produkte in einem 1,5 %-igen Agarose-Gel in TBE-Puffer von den Primern und anderen PCR-Reagenzien bei 120 V elektrophoretisch getrennt und anschließend mittels QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt. Die Ligation der PCR-Produkte erfolgte zunächst in den pGEM-T easy-Vektor (Promega) – ein linearisierter high-copy Vektor mit poly-Thymidin-Überhang und den Restriktionschnittstellen *EcoRI* und *NotI* in der multiple cloning site (MCS) (Siehe Abbildung 7).

Siehe Tabelle 6

Tabelle 6: Übersicht über Restriktionsschnittstellen und Stop-Codons in den Zielgenen der gpZytokine

Primername	Beschreibung
gpGM-CSF for	– 3' enthält <i>Bam</i> HI site gefolgt von Kosak-box und Start Codon
gpGM-CSF rev	– 5' enthält Stop Codon
gpIL4 for	– 3' enthält <i>Bam</i> HI site gefolgt von Kosak-box und Start Codon
gpIL4 rev	– 5' enthält hinter <i>Xho</i> I site Stop Codon

pGEM®-T Easy Vector Map and Sequence Reference Points

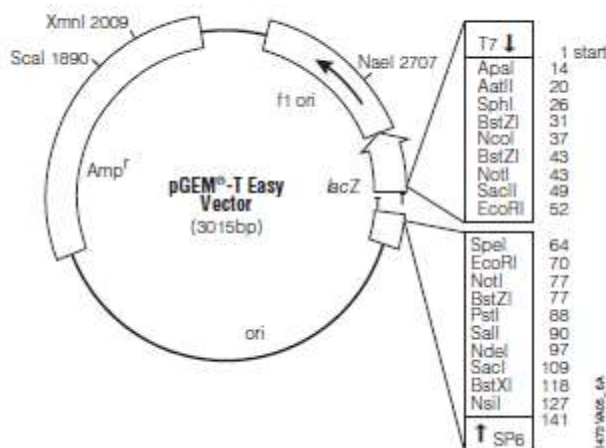


Abbildung 7: Vektorkarte mit Angabe der Restriktionsschnittstellen im pGEM-T Easy Vektor

6.6.4. Ligation in den pGEM-T easy-Vektor

Für die Ligationen wurden 50-200 ng Vektor-DNA pro Reaktion verwendet. Insert und Vektor wurden in einem Verhältnis von 3:1 und in einem Volumen von 10 µL für 5 min bei 45° C inkubiert. Danach wurden 4 µL Ligationspuffer (NEB) und 2 µL T4 DNA-Ligase (NEB) hinzugegeben und mit 4 µL DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat - PEI) auf ein Ligationsvolumen von 20 µL aufgefüllt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das ligierte Konstrukt wurde direkt für die Transformation von kompetenten *E.coli* verwendet oder bei -20° C gelagert.

6.6.5. Transformation von *E.coli* mit pGEM-gpIL4 bzw. pGEM-gpGM-CSF

Für jedes Vektorkonstrukt wurden „5-alpha competent *E.coli*“-Stamm (High Efficiency – NEB #C2987I) enthaltende 1,5 mL-Reaktionsgefäße auf Eis aufgetaut, die ligierten Vektoren pGEM-gpIL4 und pGEM-gpGM-CSF je zu den zu transformierenden Bakterien in Form des gesamten Ligationsvolumens hinzugefügt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock zur DNA-Aufnahme bei 42° C im Wasserbad für 30 s, wobei darauf zu achten war, dass die Ansätze nach dem Hitzeschock sofort wieder auf Eis gegeben wurden. 900 mL SOC-Medium (PEI) wurden hinzugegeben und bei 37° C bei 220 rpm schüttelnd für 45 min inkubiert. Die Ansätze wurden abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min), das *E.coli*-Pellet in maximal 100 µL LB-Medium resuspendiert und auf Ampicillin-Agar-Platten ausgestrichen, um die Platten bei 37° C über Nacht zu inkubieren.

Am Tag nach erfolgreicher Transformation konnten auf der Platte gewachsene Kolonien gepickt und in LB-Medium (PEI) mit 100 µg/mL Ampicillin über weitere 24 h schüttelnd bei 220 rpm und 37° C angezogen werden. Ein Kontrollverdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Siehe Tabelle 6) bestätigte eine erfolgreiche Integration der PCR-Produkte in den pGEM-Vektor. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 wurden die Flüssigkulturen geerntet und die Plasmide mittels Plasmid Midi Kit 25 (Qiagen, 12143) isoliert. Vorteile des pGEM-Vektors sind u.a., dass es sich dabei um einen Klonierungsvektor handelt, bei dem die Ligation von PCR-Amplifikaten besonders effizient ist. Zusätzlich enthält er Primerbindungsstellen, die eine Sequenzierung des PCR-Produkts erlauben. Durch eine Multiple-Cloning-Site ist es nicht unbedingt erforderlich entsprechende Schnittstellen im Amplifikat während des Primerdesigns bedenken zu müssen.

Nachdem die Amplifikate auf Richtigkeit überprüft und die entsprechenden Plasmide isoliert waren, wurden die Fragmente wieder mittels Restriktionsverdau aus dem Klonierungsvektor entfernt und in einen weiteren Expressionsvektor pMyc-IRES-GFP kloniert (Siehe Abbildung 8), da dem pGEM-Vektor keine eukaryontische Promotorregion und die nötigen Regionen für eine erfolgreiche Integration der Genkassette in Viruspartikel fehlen. Der Restriktionsverdau erfolgte mit den Enzymen *Bam*HI und *Not*I. Nach erfolgreicher Transformation mit diesem Vektor wurden die *E.coli*-Transformanten wie oben beschrieben angereichert, um erneut eine Midi-Präparation anzuschließen.

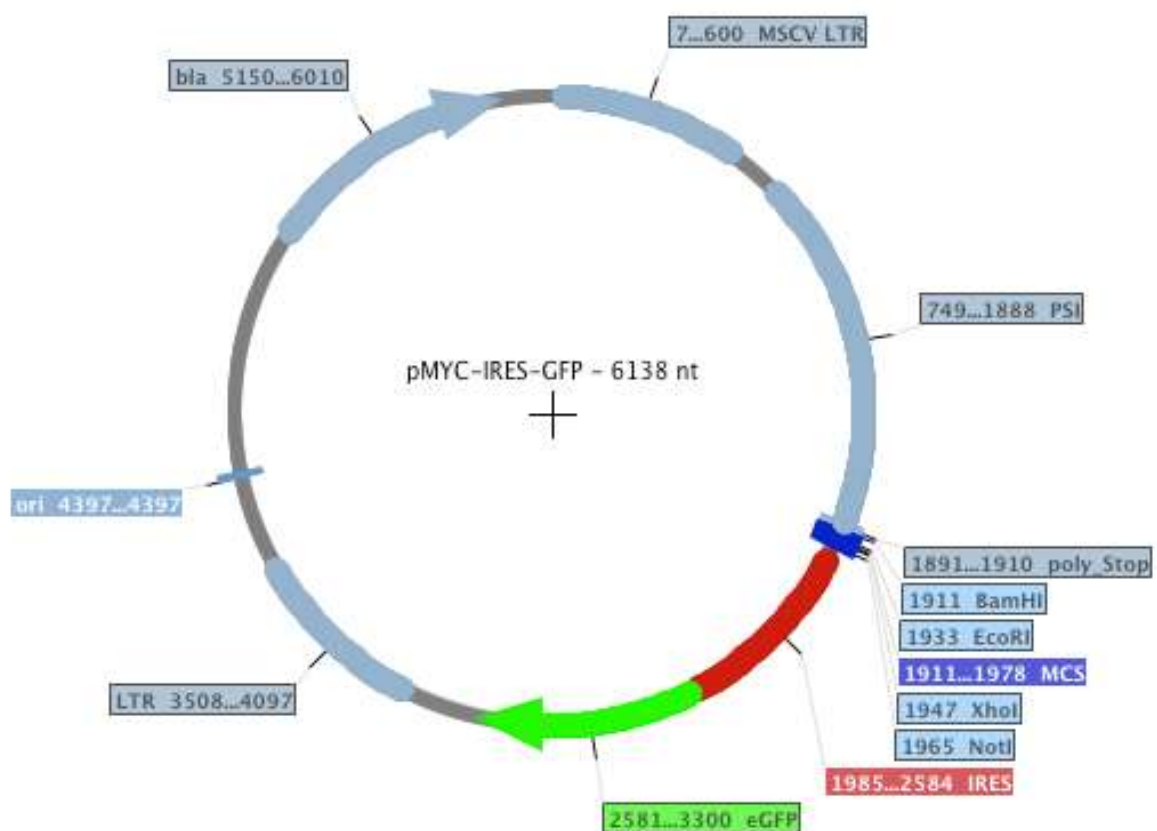


Abbildung 8: Vektorkarte mit Angaben der Restriktionsschnittstellen des pMYC-IRES-GFP-Vektors

6.6.6. Transfektion von PlatinumE-Zellen

Für die Transfektion wurden PlatE-Zellen mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/mL in SF-IMDM (PEI) und 10 % FCS (Sigma) in einem Endvolumen von 12 mL in einer kleinen Zellkulturflasche (nunc) eingesät und bei 5,5 % CO₂ und 37° C über Nacht kultiviert. Zur Einbringung von Fremd-DNA in PlatE-Zellen wurde am nächsten Morgen die Calciumphosphat-Methode gewählt. Zur Hemmung lysosomaler DNasen zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen und ca. 8 mL SF-IMDM, dem 25 µM Chloroquin (Sigma) hinzugefügt wurde, bedeckt und für 30 min bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Indes wurden je 20 µg der aufgereinigten Vektorkonstrukte in 920 µL CaCl₂ (0,2717 M) und 80 µL Reinstwasser (PEI) aufgenommen. Durch Auspusten einer Glaspipette mit Hilfe einer elektrischen Pipettierhilfe wurden nach Zugabe von 1 mL 2x BES/PO₄-Puffer (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄; auf pH 7.10 @ RT (+/- 0.05 pH) mit 4 N NaOH) für ca. 20 s Luftblasen in das System eingebracht. Das DNA-Gemisch wurde auf die vorbereiteten Zellen in die Zellkulturflaschen gegeben, mittels sanfter Kreisbewegungen der Zellkulturflasche im vorgelegten Medium vermischt und die PlatE-Zellen in der Zellkulturflasche mit den Vektorkonstrukten über Nacht bei 37° C und 5,5 % CO₂ inkubiert. Nach 15 h wurde ein Mediumswechsel vorgenommen, in dem das vorhandene Medium aus der Zellkulturflasche abgezogen und frisches SF-IMDM, dem 10 % FCS zugesetzt waren, hinzugegeben wurde. 24 h später konnte das Medium geerntet werden, in dem sich nun die durch die PlatE-Zellen reproduzierten und sezernierten Viruspartikel befanden. Mit Hilfe dieser geernteten Viruspartikel konnte darauffolgend die Mauszelllinie 38B9 transduziert werden.

6.6.7. Transduktion von 38B9-Zellen

Vorbereitend wurden 38B9-Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 in einer T75-Zellkulturflasche in SF-IMDM mit 2 % FCS über Nacht bei 5,5 % CO₂ und 37° C im Brutschrank kultiviert. Zur Entfernung des Zelldedritus wurden die am Vortag geernteten Viruspartikel im Überstand des Mediums der PlatE-Zellkultur bei 3000 x g und 4° C für 10 min zentrifugiert. Zur Konzentrierung der Viruspartikel wurde der Überstand abgenommen und in neue Gefäße überführt. Die Ansätze wurden für 60 min bei 4° C und 10000 x g zentrifugiert, so dass die Viruspartikel als Pellet in der konischen Spitze des Gefäßes gelangten und der Überstand verworfen werden konnte. Auf Eis arbeitend wurde das Viruspartikelpellet anschließend in 1,5 mL SF-IMDM, dem 2 % FCS und 5 µg/mL Polypren (Sigma) zugesetzt waren, aufgenommen und gut resuspendiert.

Das Kulturmedium von den 38B9-Zellen wurde anschließend abgezogen und die Zellen vorsichtig mit den Viruspartikeln betropft. Die Zellkulturplatte wurde bei 700 x g und 37° C für 1 h zentrifugiert und anschließend für weitere 60 min bei 37° C und 5,5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurde das Transduktionsmedium abgenommen und die 38B9-Zellen mit 2 mL frischem SF-IMDM mit 2 % FCS bedeckt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte eine erfolgreiche Transduktion anhand des Reporterproteins GFP 24 h später visuell überprüft werden (Siehe Abbildung 28).

6.6.8. Limiting Dilution und Ernte der Zytokine

Für jedes der gewünschten Meerschweinchenzytokine erhielt man auf diesem Weg eine dem Konstrukt entsprechende, transduzierte 38B9-Zellpopulation. Da die Transduktionseffizienz bei weniger als 100 % liegt, mussten erfolgreich transduzierte Zellen, die anhand des exprimierten grün fluoreszierenden Proteins (GFP) im Fluoreszenzmikroskop erkennbar waren, von den nicht grün leuchtenden Zellen getrennt werden. Mittels Grenzverdünnungsklonen (engl. *Limiting Dilution Cloning*) wurden die transduzierten 38B9-Zellen aus der 24-Well-Platte geerntet und auf eine Zelldichte verdünnt, die in der Theorie genau eine Zelle pro Kavität einer 96-Rundboden-Platte erlaubt und in 100 μ L je Kavität ausgesät. Durch optische Überprüfung mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm der einzelnen Kavitäten konnten jene Klone, die grün leuchteten, weiter vermehrt werden. So ließ sich für beide Meerschweinchenzytokine eine transduzierte Zellpopulation anziehen, die in der Lage war, das Meerschweinchenzytokin zu exprimieren und zu sezernieren. Mittels Überstandsernte konnte so jeder Zeit das entsprechende Zytokin für weitere Zwecke entnommen werden.

6.6.9. Funktionsüberprüfung und Titration der Meerschweinchen-Zytokine

Zur Funktionalitätsprüfung der rekombinant exprimierten Meerschweinchenzytokine wurden Meerschweinchenmonozyten benötigt. Für diese Experimente wurden Meerschweinchen tief anästhesiert wie in 6.1.2 beschrieben. Mittels Herzpunktion wurden die Meerschweinchen vollständig entblutet. Dabei war eine Ausbeute von ca. 35 mL Citratblut (1 % 0,1 M Tri-Natrium-Citrat) zu verzeichnen. Anschließend wurden die narkotisierten und bereits entbluteten Tiere mittels CO₂-Begasung getötet.

Aufbereitung von Meerschweinchen-PBMCs und Monozytenisolation

Das zuvor entnommene Blut wurde wie in 0 mittels Ficollgradientenzentrifugation aufgereinigt, die isolierten PBMCs nach zweimaligem Waschen in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/mL in SF-IMDM/ 5 % autologem Serum aufgenommen und in einer mit Kollagen beschichteten 6-Well-Mikrotiterplatte (nunc) ausgesät. Die Platte inkubierte für 60 min bei 37° C und 5,5 % CO₂ im Brutschrank, damit die zur Adhärenz gebrachten Monozyten später von den Suspensionszellen getrennt werden konnten, in dem die Suspensionszellen vorsichtig abgenommen wurden und die adhärenen Monozyten auf der Kollagenplatte zurückblieben. Die Kollagenplatte mit den adhärenen Zellen wurde mit 2 mL SF-IMDM, das um 5 % autologem Serum, 100 μ L gpGM-CSF-Überstand und 10 μ L gpIL4-Überstand ergänzt wurde, überdeckt und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Suspensionszellen dagegen wurden

noch einmal abzentrifugiert und in einer Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen in SF-IMDM mit 5 % FCS aufgenommen.

Monozyten wurden mit um gpGM-CSF und gpIL4 ergänztes SF-IMDM und 5 % autologem Serum stimuliert. Dafür wurden Titrationsexperimente mit den Überständen von den stabil transduzierten gpGM-CSF- und gpIL4-38B9-Zellen gemacht, um das optimale Volumen zu finden, auf das die behandelten Zellen reagieren. Die Zellen wurden für 24 h bei 37° C und 5,5 % CO₂ inkubiert, wobei an Tag 0 und 1 eine FACS-Färbung angesetzt wurde, die auf CD1-Expression hin untersuchte.

6.6.10. FACS-Färbung

Für die FACS-Färbung wurden aus Monozyten abgeleitete Zellen verwendet, die mit rekombinanten gpGM-CSF und gpIL4 stimuliert wurden (Siehe Abschnitt 6.6.9). Die Zellen wurden für die Färbung auf 1×10^6 Zellen/mL in PBS/1 % FCS eingestellt. Für jeden Ansatz wurden 1×10^5 Zellen in eine 96-Deep-Well-Platte (Brand) gegeben. Vor Hinzugabe des ersten Antikörpers wurden die Zellen in dieser 96-Deep-Well-Platte zweimal gewaschen (2190 x g; 5 min). Der Überstand wurde verworfen und den Zellen 5 µL Fc-Block (Dr. Jörg Kirberg; PEI) [84] hinzugegeben und für 5 min inkubiert. Daraufhin folgte die Zugabe des ersten Antikörpers (Siehe Tabelle 7), der für 1 h bei 4 °C inkubiert. Dieser Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS/1 % FCS (2190 x g; 5 min) entfernt, der zweite Antikörper dazu gegeben und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte ein letzter Waschschrift mit PBS/1 % FCS (2190 x g; 5 min), der Überstand durch Ausschlagen der Platte verworfen, die Zellen in 100 µL PBS/1 % FCS aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie (BD Accuri) analysiert.

Tabelle 7: Pipettierschema für die FACS-Färbung

1x	1 st AB	Volumina 1 st
1	α hCD1bPEI only	20 µL AB soup pur
2	α rabies only	20 µL AB soup pur
3	/	100 µL PBS/FCS
4	/	100 µL PBS/FCS

1x	2 nd AB	Volumina 2 nd
1	α mouse ^{PE-Cy5.5}	0,2 µL auf 20 µL PBS
2	α mouse ^{PE-Cy5.5}	0,2 µL auf 20 µL PBS
3	α mouse ^{PE-Cy5.5 (2nd only)}	0,2 µL auf 20 µL PBS
4	/ (Cells only)	100 µL PBS/FCS

6.7. Der ex vivo Lipid-Assay

Für den *ex vivo* Lipid-Assay wurden iAN5-sensibilisierte Meerschweinchen verwendet. Die wie in 6.6.9 beschrieben generierten adhärenenten Monozyten wurden für 24 h mit gpIL4 und gpGM-CSF stimuliert, so dass sie sich zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) differenzieren konnten.

24 h nach Blutentnahme wurden die inzwischen differenzierten APCs geerntet, mit 30 Gy einer Cäsiumquelle bestrahlt, gezählt und im Verhältnis 1:2 mit den restlichen Suspensions-PBMCs zusammen gegeben, um sie mit CFSE zu färben. Dafür wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^7 /mL PBS eingestellt und ein Wasserbad auf 37° C beheizt, um sie mit 20 µL einer 5 µM CFSE/PBS-Lösung für 14 min darin zu färben. Das Färben wurde durch eine 2 mL PBS/1 % FCS abgestoppt und den Zellen zwei Waschschrte unterzogen (2190 x g, 5 min). Wie in Abschnitt 6.2 bereits erwähnt war auch hier unbedingt darauf zu achten, dass die Zellen vor der Färbung zweimal mit reinem PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden sie in SF-IMDM mit 5 % autologem Serum in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/mL mit definierten mykobakteriellen CD1b-restringierten Lipiden inkubiert. Bei den definierten mykobakteriellen Lipiden handelte es sich um GMM (Glucosemonomycolat), PIM₂ (Phosphatidylinositol-di-mannosid) und ManLAM (Mannosyliertes Lipoarabinomannan), die je in einer Konzentration von je 1 µg/mL eingesetzt wurden. Die Ansätze inkubierten 5 Tage bei 37° C und 5,0 % CO₂, bevor sie mittels Durchflusszytometer hinsichtlich grüner Fluoreszenzintensität analysiert wurden.

7. Ergebnisse

7.1. Der Tuberkulin-Hauttest zeigt Dosisabhängigkeit

Bei der Etablierung der neuen Methode zum Ersatz des Tuberkulin-Hauttest (TST), dem *ex vivo* T ϕ -Proliferations-Assays, wurden beide Methoden parallel durchgeführt. Der TST wurde dabei unter geringen Änderungen (Gruppengröße der Tiere; Sensibilisierungsstrategie) wie im Europäischen Arzneibuch (8. Edition) 01/2008:0536 angezeigt, durchgeführt.

Für den TST wurden mindestens sechs Meerschweinchen entweder mit dem attenuierten Lebendimpfstoff BCG oder mit inaktiverter Feuchtmasse des *M.bovis*-Stamms AN5 sensibilisiert. Dreißig Tage später wurden die Flanken der Tiere unter Narkose rasiert und je drei Konzentrationen des WHO-Referenztuberkulins und des bovinen Testtuberkulins intradermal injiziert. Die einzelnen Konzentrationen wurden in Duplikaten angesetzt. 24 h nach Tuberkulinisierung erfolgte die Datenerhebung durch Ausmessen der entstandenen Hautläsionen (Siehe Abschnitt 6.1). Beim TST ergibt sich die Datenerhebung einer einzelnen Läsion aus je einer horizontalen und einer vertikalen Durchmesserablesung mittels Lineal von zwei verschiedenen Personen, so dass pro Hautläsion insgesamt vier Durchmesser in mm ermittelt wurden. Um systematische Applikationsfehler und Subjektivität des Ablesenden, der am Tag zuvor auch injiziert hat, beim Ablesen der Läsionen zu vermeiden, wurden die zu testenden Tuberkuline im Sinne eines Lateinischen Quadrats auf die verschiedenen Applikationsorte verteilt und intradermal injiziert (Siehe Rohdatenblatt im Anhang - Abbildung 33).

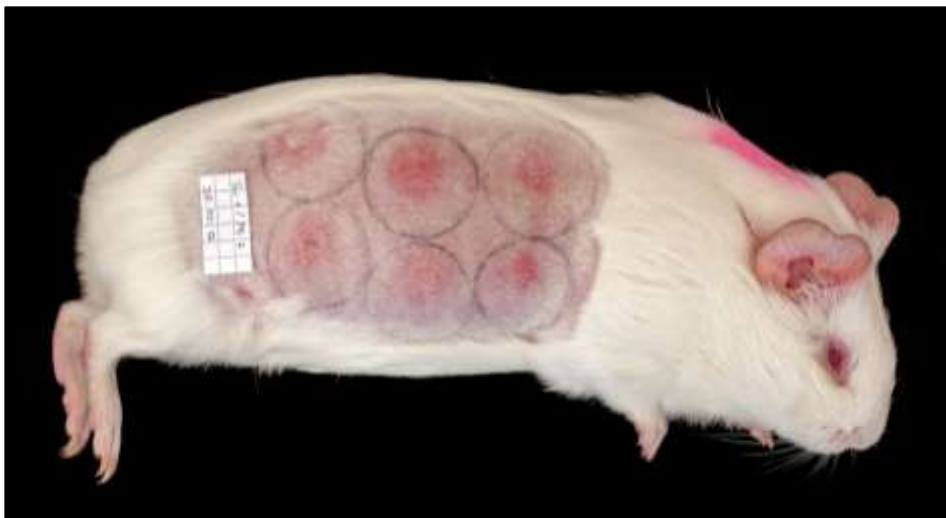


Abbildung 9: Schwach sediertes Meerschweinchen mit Hautläsionen 24 h nach Tuberkulinisierung – (Foto: Claudia Dumke, PEI).

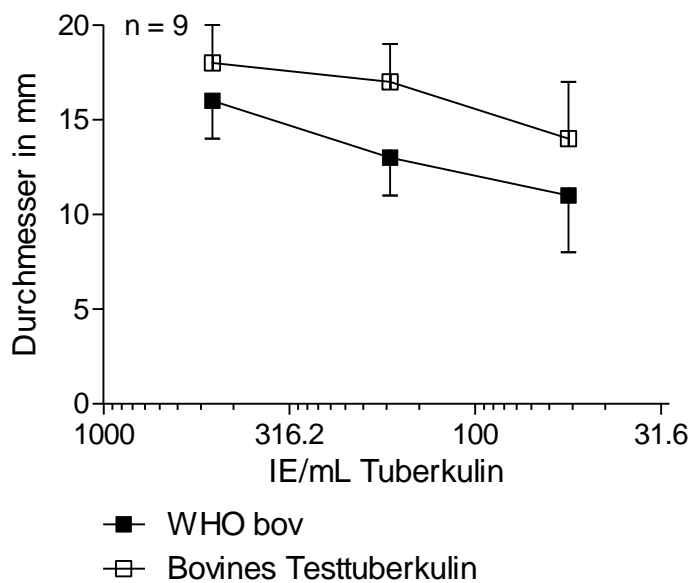


Abbildung 10: Der Tuberkulin-Hauttest zeigt dosisabhängige Hautläsionsgrößen 24 h nach intradermaler Tuberkulininjektion in sensibilisierten Meerschweinchen. Die Abszisse zeigt die drei getesteten Tuberkulinkonzentrationen (509 IE/mL, 169 IE/mL und 56 IE/mL); die Ordinate die entstandenen Durchmessergrößen der Hautläsionen in Millimeter. Das schwarze Quadrat symbolisiert das bovine WHO-Referenz tuberkulin; das weiße Quadrat das bovine Testtuberkulin. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung über die gemittelten Duplikate von je neun Tieren an.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, erhält man nach Injektion unterschiedlicher Dosen an Tuberkulin unterschiedlich große Hautläsionen, wobei laut Monografie des Europäischen Arzneibuchs Läsionen zwischen 8 und 25 mm als valide anzusehen sind [7]. Unter Verwendung der CombiStats-Software (EDQM) wurden für jedes einzelne Tier alle vier Messwerte je Läsion des Prüftuberkulins gegen alle vier Messwerte des WHO-Referenz tuberkulins verwendet, um die Wirkstärke des Prüftuberkulins anhand der Wirkstärke des Referenz tuberkulins zu berechnen (Siehe Abbildung 9 und Abbildung 10).

7.2. Der ex vivo T ϕ -Proliferations-Assay quantifiziert antigenspezifische T ϕ -Proliferation bei sensibilisierten Meerschweinchen

Wie in 6.2 beschrieben wurden mindestens sechs Meerschweinchen entweder mit BCG oder mit inaktivierter Feuchtmasse des *M.bovis*-Stamms AN5 sensibilisiert. Dreißig Tage darauf wurden die Meerschweinchen narkotisiert und Citrat-Blut mittels Herzpunktion entnommen. Nach Aufreinigen der PBMCs (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) durch Ficoll-Gradientenzentrifugation wurden die Zellen mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff namens CFSE (Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester) gefärbt und im 96-Kavitäten-Format für fünf Tage mit acht verschiedenen Konzentrationen beginnend bei 30 IE/mL hinab bis 0,01 IE/mL Tuberkulin (Testtuberkulin und WHO-Referenztuberkulin je in Duplikaten) stimuliert (Siehe Abbildung 6). Anschließend wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich des Verlusts des Fluoreszenzfarbstoffs analysiert.

Dabei war das Bild im Forward-Side-Scatter-Plot mit ein paar wenigen toten Zellen, wenige Thrombozyten und hauptsächlich Lymphozyten erwartungsgemäß. Bei Auswertung des T ϕ -Proliferations-Assays mittels Durchflusszytometrie wurde zunächst im Forward-Side-Scatter-Plot die Lymphozytenpopulation durch Einziehen eines bestimmten Bereichs (engl. *Gate*) in den Fokus gerückt (Abbildung 11 A). Diese Population wurde dann hinsichtlich ihrer grünen Fluoreszenz (CFSE emittiert ca. bei 520 nm) in einem Forward-Scatter-Fluorescence 1 Plot näher betrachtet. Dabei sind die CFSE-schwachen Zellen diejenige Population von Interesse. Zur Quantifizierung dieser Population wurde ein Polygon um denjenigen Bereich gezogen, der als CFSE-schwachen Bereich definiert wurde (Abbildung 11 B). Für jedes Meerschweinchen wurden diese Bereiche anhand von Positiv- und Negativkontrolle neu definiert.

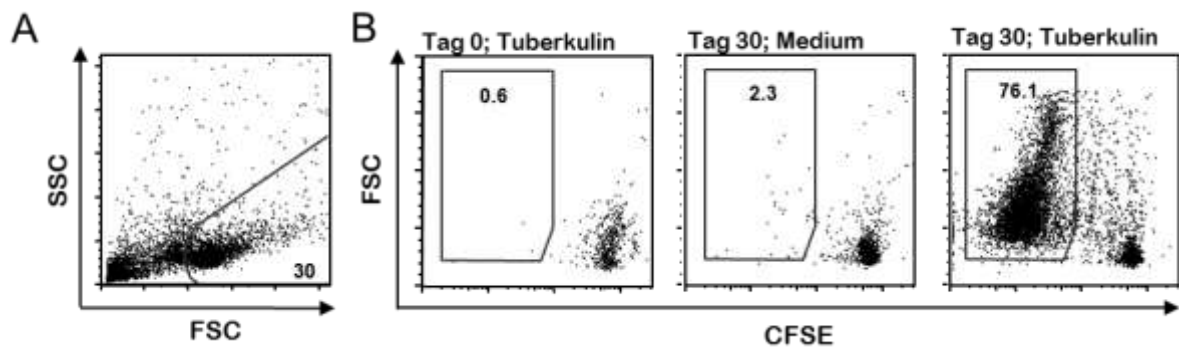


Abbildung 11: Die *ex vivo* Tuberkulinstimulation induziert antigenspezifische Lymphozytenproliferation in sensibilisierten Meerschweinchen. PBMCs wurden vor bzw. 30 Tage nach Sensibilisierung der Meerschweinchen mit mykobakterieller Feuchtmasse des AN5-Stamms isoliert, mit CFSE gefärbt, mit 30 IE/mL *in vitro* stimuliert und nach 5 Tagen Inkubation mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Aufgrund der Forward-Scatter-Charakteristika ist die typisch auftretende Lymphozytenpopulation mit einer schwarz umrandeten Zone definiert worden. Diese Population wird anschließend auf ihre grüne Fluoreszenzintensität hin untersucht, wobei die fluoreszenzschwache Population zu quantifizieren ist (B).

Abbildung 11 B zeigt in jedem Dotplot auf der Abszisse eine CFSE-intensive Zellpopulation im rechten unteren Quadranten des Plots. Dabei handelt es sich um diejenigen Zellen, die nicht proliferiert sind. Wie oberhalb der Plots beschriftet, ist von links nach rechts exemplarisch einen Plot von Tag 0, an dem die Meerschweinchen nicht sensibilisiert sind, die Zellen aber mit Tuberkulin stimuliert wurden, dargestellt. Da die Zellen nicht nach links in den CFSE-reduzierten Bereich des Plots ausschwärmen, ist ersichtlich, dass sie trotz Tuberkulinstimulation nicht proliferiert sind. Daneben sind zwei exemplarische Plots abgebildet, die dagegen Proben eines sensibilisierten Meerschweinchens an Tag 30 zeigen. Dabei ist die Mediumskontrolle einer mit Tuberkulin stimulierten Probe gegenüber gestellt. Im Plot rechts außen ist erkennbar, dass ein Großteil der Lymphozytenpopulation nach links ausschwärmt, was durch einen Verlust an CFSE durch mehrere Proliferationszyklen zu erklären ist. Dieses Phänomen dient im T ϕ -Proliferations-Assay als Endpunkt dosisabhängiger Datenerhebung. Durch Ermittlung des prozentualen Anteils proliferierter Zellen von den Lymphozyten insgesamt erhält man Daten, die zur Berechnung der Wirkstärke des Testtuberkulins gegen das WHO-Referenztuberkulin geeignet sind.

Nach durchflusszytometrischer Analyse konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen der Tiere vor der Sensibilisierung an Tag 0 nicht mit Tuberkulin stimulieren lassen. Dreißig Tage nach der Sensibilisierung reagieren die Zellen aller Tiere auf eine *ex vivo* Tuberkulinstimulation mit einer deutlichen Proliferation (Siehe Abbildung 12) . Vergleicht man bei der ersten

Blutung nach Sensibilisierung die Mediumskontrolle mit den Tuberkulin stimulierten Proben, ist ein deutlicher Anstieg der Proliferation aufgrund von Tuberkulinstimulation *ex vivo* zu detektieren (Siehe Abbildung 13). Im Laufe der Etablierungsphase wurde als Validitätskriterium festgelegt, dass in der Negativkontrolle (Medium ohne Stimulation) maximal 10 % die CFSE-Färbung verloren haben, wohingegen die mit PHA (Phytohämagglutinin) stimulierte Positivkontrolle über 20 % proliferierte Zellen aufweisen muss.

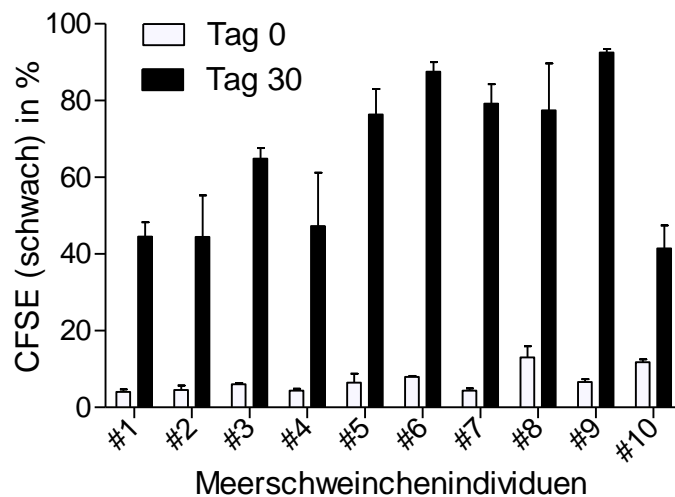


Abbildung 12: *Ex vivo* Tuberkulinstimulation induziert erst nach vorangegangener Sensibilisierung mit *M.bovis*-Stamm AN5 antigenspezifische Lymphozytenproliferation in zehn Meerschweinchen. Die Ordinate zeigt den prozentualen Anteil der definierten Lymphozytenpopulation an CFSE-schwachen Zellen. Weiße Balken symbolisieren die Ergebnisse für die Quantifizierung der auf die Stimulation mit 30 IE/mL hin proliferierten gpPBMCs von nicht sensibilisierten Meerschweinchen an Tag 0 und die schwarzen Balken vergleichend dagegen die Ergebnisse für die Quantifizierung der auf die Stimulation mit 30 IE/mL hin proliferierten gpPBMCs derselben, aber nun sensibilisierten Meerschweinchenindividuen an Tag 30. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Duplikate eines Tieres.

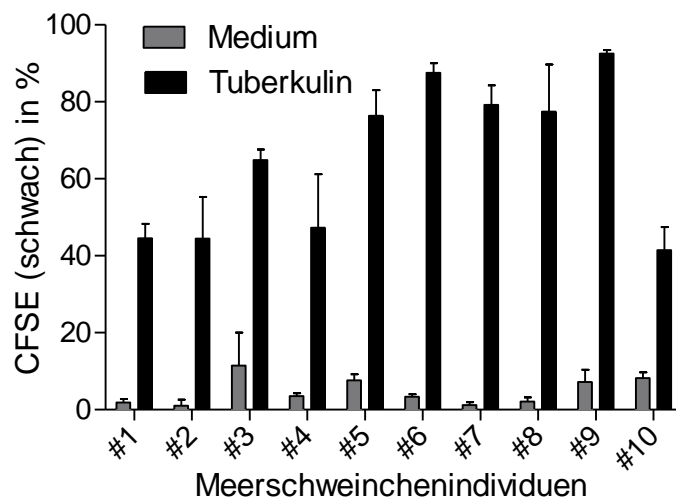


Abbildung 13: Die quantifizierbare Lymphozytenproliferation an Tag 30 ist antigenspezifisch und bedarf zwingend eine voran gegangene Sensibilisierung. Die isolierten PBMCs benötigen Tuberkulin für eine antigenspezifische Immunantwort. Die Ordinate zeigt den prozentualen Anteil derjenigen Lymphozyten, die als schwach fluoreszierend definiert wurden. Die grauen Balken symbolisieren dabei die Ergebnisse der unbehandelten Mediumskontrolle eines jeden Individuums; die schwarzen Balken vergleichen daneben die mit 30 IE/mL stimulierten PBMCs. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus den Duplikaten des jeweiligen Individuums.

7.2.1. Die Sensibilisierungsstrategie beeinflusst die Intensität der späteren Immunantwort

Die Sensibilisierungsstrategie spielt bei der Immunantwort auf Tuberkulinstimulation *ex vivo* eine wichtige Rolle. Um zu vergleichen, wie sich die Sensibilisierungsmethode auf die Immunantwort auf Tuberkuline *ex vivo* auswirkt, wurden jeweils sechs Tiere entweder durch eine intramuskuläre Injektion einer definierten Menge an inaktivierter Feuchtmasse des virulenten *M. bovis*-Stammes AN5 sensibilisiert oder mit einer definierten Menge attenuiertem Lebendimpfstoff BCG subkutan geimpft. Zusätzlich galt es die Frage zu beantworten, ob Tierzahlen reduziert werden können (Reduction), wenn man ein und dieselbe Gruppe für mehrere Blutungen in einem Abstand von 30 Tagen verwendet. Wie in Abbildung 14 gezeigt, reagierten die Tiergruppen an Tag 0, an dem sie noch nicht sensibilisiert sind, nicht auf Tuberkulinstimulation *ex vivo*. An Tag 30, der ersten Blutung nach Sensibilisierung, war die stärkste Stimulierbarkeit der Meerschweinchenlymphozyten zu verzeichnen. Dabei fiel auf, dass die PBMCs derjenigen Meerschweinchen, die mit inaktivierter Feuchtmasse sensibilisiert wurden, auf eine spätere *ex vivo* Tuberkulinstimulation intensiver reagieren, verglichen zu der Proliferationsintensität, die bei mit BCG sensibilisierten Tieren erreicht werden konnte. Auffällig war der Unterschied in der Stimulierbarkeit der Zellen an Tag 60: Bei der zweiten Blutung nach Sensibilisierung waren die Zellen der Tiere, die mit BCG sensibilisiert wurden, eindeutig nicht stimulierbar, wohingegen die Zellen von mit inaktivierter Feuchtmasse sensibilisierten Tieren nur eine leicht schwächere Proliferation zeigten. An Tag 90 blieb die Stimulierbarkeit der Zellen derjenigen Tiere, die mit inaktivierter Feuchtmasse sensibilisiert waren, konstant zur vorangegangenen Blutung, wohingegen die Zellen der Tiere, die mit BCG sensibilisiert wurden, eine ähnliche Stimulierbarkeit zeigten, wie an Tag 30. Da die Immunantwort der Meerschweinchen nach Sensibilisierung mit inaktivierter Feuchtmasse des virulenten *M. bovis*-Stammes AN5 stärker und konsistenter war, wurden alle weiteren Experimente mit AN5-sensibilisierten Meerschweinchen durchgeführt.

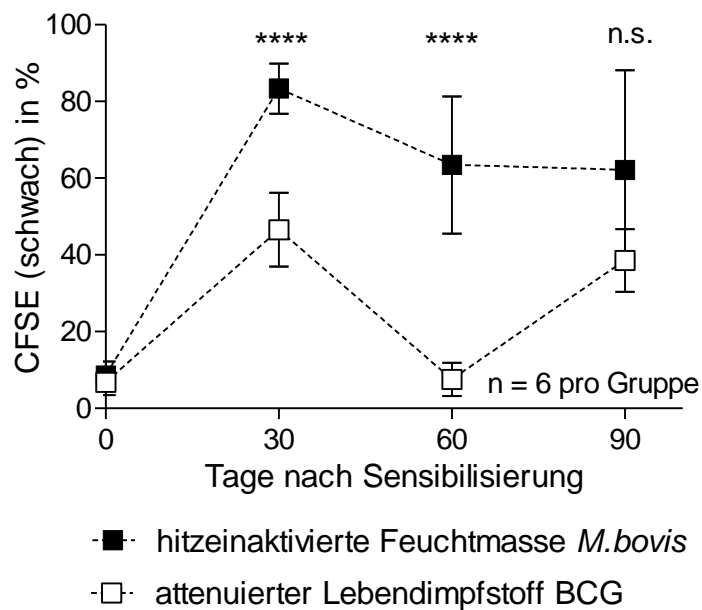


Abbildung 14: Die Sensibilisierungsstrategie hat Einfluss auf die Intensität der durch Tuberkulinstimulation induzierten Immunantwort von isolierten gpPBMCs. Zu vier verschiedenen Zeitpunkten wurde bei zwei Gruppen vergleichend Blut entnommen und der T ϕ -Proliferations-Assay durchgeführt. Je sechs Meerschweinchen wurden entweder mit inaktivierter Feuchtmasse vom *M.bovis*-Stamm AN5 oder dem attenuierten Lebendimpfstoff BCG sensibilisiert. Die PBMCs der Meerschweinchen wurden mit 30 IE/mL des bovinen WHO-Referenztuberkulins *ex vivo* stimuliert. Die Ordinate zeigt den prozentualen Anteil derjenigen Lymphozyten, die als schwach fluoreszierend definiert wurden. Die Abszisse zeigt die Blutentnahmezeitpunkte nach Sensibilisierung der Meerschweinchen. Die schwarzen Quadrate symbolisieren die Ergebnisse der Gruppe, die mit AN5 sensibilisiert wurden; die weißen Quadrate symbolisieren die Ergebnisse der Meerschweinchengruppe, die mit BCG sensibilisiert wurde. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung über alle gemittelten Duplikate der sechs Tiere einer Gruppe. Die Signifikanz wurde mittels T-Test für unverbundene Stichproben ermittelt.

7.2.2. Der T ϕ -Proliferations-Assay zeigt einen dosisabhängigen Bereich über zwei bis drei Logarithmusstufen

Ein Primärkriterium für Potenzbestimmungen ist die Messbarkeit einer Dosis-Wirkungs-Beziehung. Dieses Kriterium sollte die Alternativmethode zum TST unbedingt erfüllen. Mit einer Gruppe, bestehend aus neun Meerschweinchen, die 30 Tage zuvor mit inaktivierter *M.bovis*-Feuchtmasse (iAN5) sensibilisiert wurden, konnte nach Titrationsexperimenten in Abbildung 15 gezeigt werden, dass die Antwort auf Tuberkulinstimulation in einem Konzentrationsbereich zwischen 30 IE/mL und 0,01 IE/mL dosisabhängig ist und sich somit über zwei bis drei logarithmische Stufen ausstreckt. Oberhalb von 30 IE/mL wirkte Tuberkulin zytotoxisch, unterhalb einer Konzentration von 0,01 IE/mL fielen die Zellen auf Mediumskontrollenniveau und zeigten keine Proliferationsaktivität mehr. In Abbildung 15 stellt jedes Symbol ein Meerschweinchenindividuum dar. Die Zellen der Tiere reagieren über einen weiten Bereich mehr oder weniger stark auf Tuberkulinstimulation. Die Immunantwort *ex vivo* jedes Individuums für sich ist dosisabhängig. Die Kreise stellen jeweils den Median über die Gruppe dar.

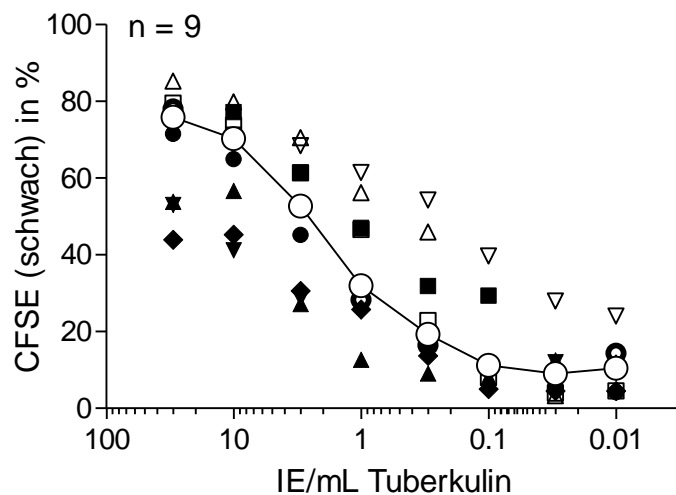


Abbildung 15: Der dosisabhängige Messbereich des T ϕ -Proliferations-Assays erstreckt sich über zwei bis drei Logarithmusstufen. Einer Gruppe bestehend aus neun sensibilisierten Meerschweinchen wurde an Tag 30 Blut entnommen und der T ϕ -Proliferations-Assay durchgeführt. Die Ordinate zeigt den prozentualen Anteil derjenigen Lymphozyten, die als schwach fluoreszierend definiert wurden. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Konzentrationen der Tuberkulinstimulation. Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert der Duplikate eines Meerschweinchenindividuums. Die verbundenen Kreise stellen jeweils den Median über die gesamte Gruppe dar. Jedes Meerschweinchen reagiert unterschiedlich intensiv auf die *ex vivo* Tuberkulinstimulation. Jedes einzelne Meerschweinchen für sich reagiert dosisabhängig.

Nachdem der Messbereich gefunden war, in dem dosisabhängige Daten zu erheben sind, wurden verschiedene Tuberkulinpräparationen miteinander verglichen und überprüft, inwieweit die neu entwickelte Methode in der Lage ist, sie voneinander zu unterscheiden. Dabei wurden zwei Referenztuberkuline der Weltgesundheitsorganisation (WHO) verwendet, deren Internationale Einheiten bereits festgelegt sind. Für die Etablierungsphase wurden deswegen zwei Referenztuberkuline ausgewählt, da es zwischen bovinem und humanen Tuberkulin große Überschneidungen hinsichtlich der darin enthaltenen Antigene gibt. Deswegen kann humanes Tuberkulin sowohl Läsionen auf der Haut von Tieren, die mit *M.bovis*-Stämmen sensibilisiert wurden, auslösen, als auch T-Zell-Proliferation *ex vivo* induzieren. Zu beachten ist dabei, dass es lediglich um die Verwendung zweier Referenztuberkuline ging und die Bestimmung der Wirksamkeit von humanem Tuberkulin mit Meerschweinchen, die mit bovinen Stämmen sensibilisiert sind, keine reale Aussage über die wahre Wirksamkeit des humanen Tuberkulins erlaubt. Die beiden Referenztuberkuline waren wie folgt konzentriert angegeben: Bovines Tuberkulin mit 11700 IE/mL und humanes Tuberkulin mit 5000 IE/mL. Im Versuch

jedoch wurden beide Tuberkuline basierend auf diesen Angaben auf 30 IE/mL eingestellt. Auch ohne CombiStats-Software ist aus Abbildung 16 ersichtlich, dass das bovine Tuberkulin zu stärkerer Proliferation führt als das humane Tuberkulin. Zu erkennen ist das an der Kurvenverschiebung in Abszissenrichtung.

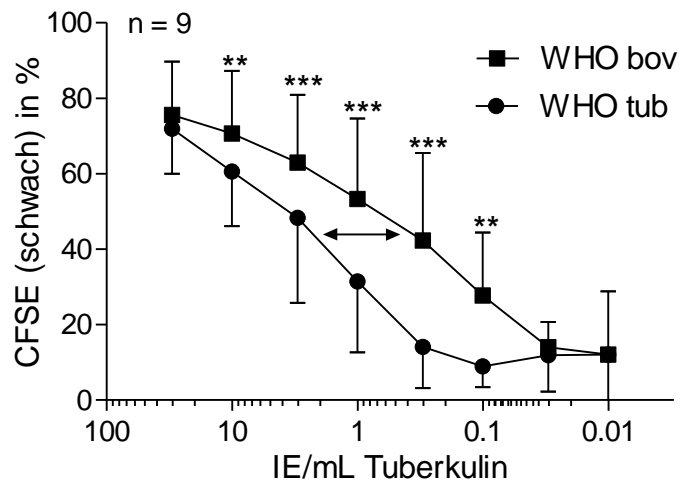


Abbildung 16: Die Verschiebung des Wendepunkts der dosisabhängigen Kurve dient der späteren Potenzberechnung. Neun sensibilisierten Meerschweinchen wurde an Tag 30 Blut entnommen und der T ϕ -Proliferations-Assay durchgeführt. Die isolierten PBMCs wurden mit je zwei Tuberkulinen (dem WHO Standard für humanes und bovines Tuberkulin) stimuliert, die auf die gleiche Stimulationskonzentration beginnend bei 30 IE/mL absteigend bis 0,01 IE/mL eingestellt waren. Die Ordinate zeigt den prozentualen Anteil derjenigen Lymphozyten, die als schwach fluoreszierend definiert wurden. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Konzentrationen der Tuberkulinstimulation. Das schwarze Quadrat zeigt die Daten für das bovine Tuberkulin; der Kreis zeigt Daten für das humane Tuberkulin. Jedes Symbol steht für den Median über die gemittelten Duplikate jedes Tieres. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung innerhalb der Tiere.

7.2.3. Die TNF α -Sekretion korreliert mit der T ϕ -Proliferation

Um einen alternativen Endpunkt zu überprüfen, wurde nicht nur die Proliferation dieser Zellpopulation als Marker für die Analyse benutzt, sondern auch das inflammatorische Zytokin TNF α , das von aktivierten T-Zellen, aber auch von Monozyten sezerniert wird, gemessen. Die Zytokinsekretion ist in Abbildung 17 dargestellt. Exemplarisch wurden dabei die Überstände aus den Kavitäten der Duplikate vom T ϕ -Proliferations-Assay 24 h nach Ansetzen der Kulturen abgenommen und TNF α mittels ELISA quantifiziert. Die Überstände aus den Duplikaten wurden zusammengegeben, so dass sich ein ELISA-Messwert je Tier und je Tuberkulin ergab. In Abbildung 17 ist der Median eines jeden Messwertes von neun Tieren dargestellt. Auch im Zytokin-ELISA konnte Dosisabhängigkeit gemessen werden. Dort ist die Dosisabhängigkeit über zwei logarithmische Stufen messbar (Vergleich Abbildung 18).

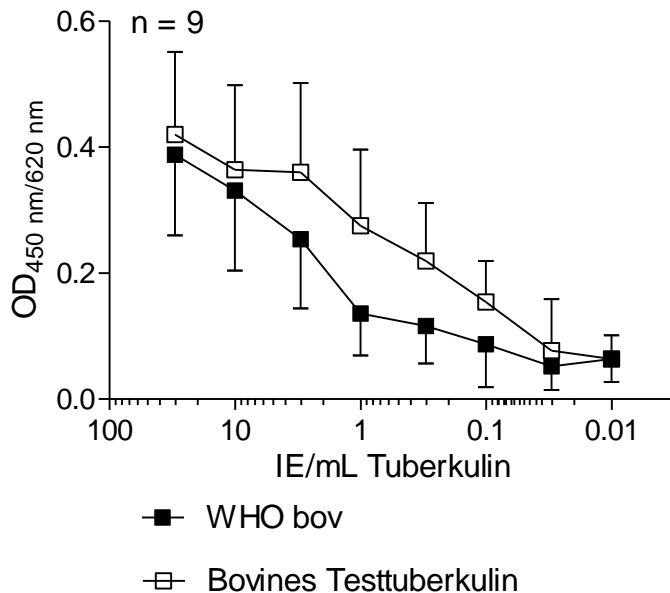


Abbildung 17: Dosisabhängige TNF α -Sekretion von aus sensibilisierten Meerschweinchen isolierten PBMCs nach Tuberkulinstimulation *ex vivo* und Durchführung des T ϕ -Proliferations-Assays. Statt die Zellen mittels Durchflusszytometrie zu analysieren, wurde der Überstand 24 h nach Stimulationsbeginn geerntet und mittels ELISA auf TNF α untersucht. Die Ordinate zeigt den photometrischen Messbereich bei 450 nm/620 nm. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Konzentrationen der Tuberkulinstimulation. Das schwarze Quadrat symbolisiert das bovine WHO-Referenztuberkulin; das weiße Quadrat repräsentiert ein bovines Testtuberkulin. Die jeweiligen Symbole stellen den Mittelwert über neun Einzeltiere, die Fehlerbalken die Standardabweichung der Werte über die neun Tiere dar.

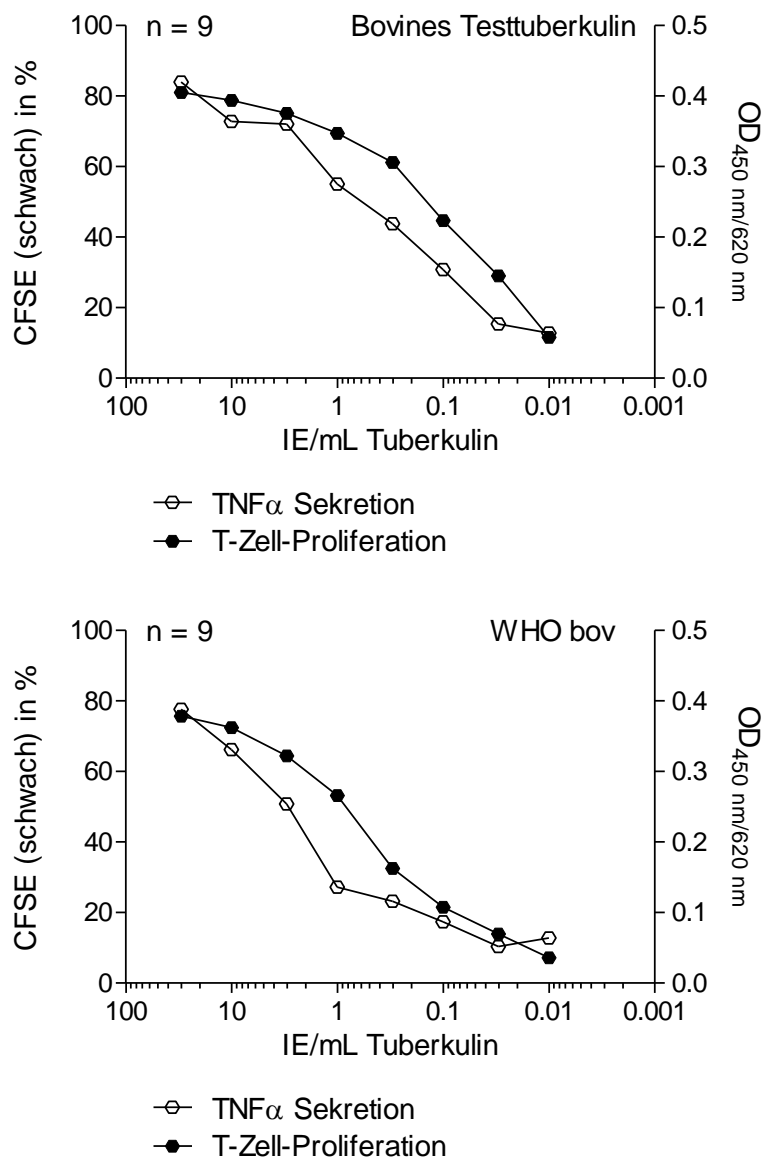


Abbildung 18: Die Zytokinsekretion verhält sich vergleichbar zur T-Zell-Proliferation. Die Zellen wurden so in Kultur genommen, dass 24 h nach Inkulturnahme Überstände für den Zytokin-ELISA abgenommen werden konnten und mit denselben Proben an Tag 5 die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt wurde. Auf der linken Ordinate ist die Skala für die als CFSE-schwach definierten Zellen angegeben und auf der rechten Ordinate für die jeweilige Optische Dichte derselben Probe im TNFα-ELISA. Die Abszisse zeigt die Tuberkulinkonzentration für die jeweiligen Messpunkte in beiden Endpunkten. Die weißen Kreise zeigen dabei die TNFα-Sekretion anhand der OD-Werte und die schwarzen Kreise die dazu korrespondierenden T-Zellproliferationswerte in % der CFSE-schwachen Zellen.

7.2.4. Der T ϕ -Proliferations-Assay misst spezifische Immunantworten

Die in Abbildung 19 gezeigte Meerschweinchengruppe wurde mit boviner Feuchtmasse sensibilisiert. Vier Wochen später wurden die PBMCs *ex vivo* im T ϕ -Proliferations-Assay mit aviären WHO-Tuberkulin stimuliert. Im Gegensatz zur Reaktion auf bovines Tuberkulin ließen sie sich mit aviärem Tuberkulin nicht zu Proliferation anregen. In Abbildung 20 ist das umgekehrte Experiment dargestellt: Eine Gruppe von acht Meerschweinchen wurde mit inaktivierter Feuchtmasse einer *M.avium*-Kultur sensibilisiert. Vier Wochen später proliferierten die T-Zellen der Tiere *ex vivo* auf die Stimulation mit aviären Tuberkulinen, reagierten aber nicht auf bovines Tuberkulin.

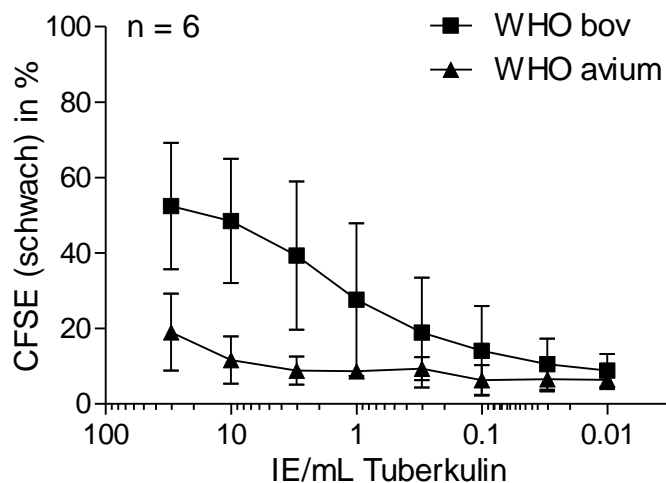


Abbildung 19: Mit inaktivierter Feuchtmasse von *Mycobacterium bovis*-Stamm AN5 sensibilisierte Tiere antworten spezifisch auf bovine Tuberkuline, jedoch nicht auf das aviäre WHO-Tuberkulin. An Tag 30 nach Sensibilisierung wurde das bovine und das aviäre WHO-Tuberkulin im T ϕ -Proliferations-Assay getestet. Die Ordinate zeigt den prozentualen Anteil derjenigen Lymphozyten, die als schwach fluoreszierend definiert wurden. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Konzentrationen der Tuberkulinstimulation. Das schwarze Quadrat symbolisiert das bovine WHO-Referenz-Tuberkulin und das schwarze, nach oben gespitzte Dreieck symbolisiert das aviäre WHO-Referenz-Tuberkulin. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung über die gemittelten Duplikate der Tiere.

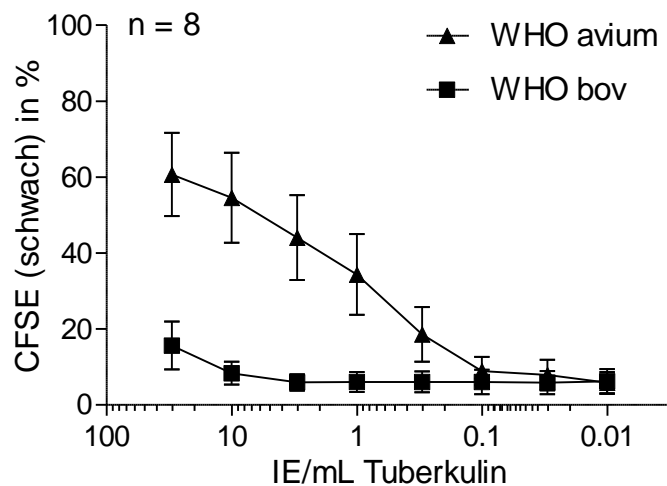


Abbildung 20: Mit inaktivierter Feuchtmasse von *Mycobacterium avium*-Stamm D4 sensibilisierte Tiere antworten spezifisch auf aviäre Tuberkuline, jedoch nicht auf das bovine WHO-Tuberkulin. An Tag 30 nach Sensibilisierung wurde das aviäre und das bovine WHO-Tuberkulin im T ϕ -Proliferations-Assay getestet. Die Ordinate zeigt den prozentualen Anteil derjenigen Lymphozyten, die als schwach fluoreszierend definiert wurden. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Konzentrationen der Tuberkulinstimulation. Das schwarze Quadrat symbolisiert das bovine WHO-Referenztuberkulin und das schwarze, nach oben gespitzte Dreieck symbolisiert das aviäre WHO-Referenztuberkulin. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung über die gemittelten Duplikate der Tiere.

7.2.5. Die mittels wiederholten T ϕ -Proliferations-Assays ermittelten Wirksamkeitsschätzer liegen eng beieinander

Während der Etablierungsphase sollte überprüft werden, inwiefern der Assay im hiesigen Labor an verschiedenen Tagen reproduzierbar ist und mehrere Male hintereinander die gleiche Wirkstärke schätzt. Dazu wurde anhand der so genannten Inter-Assay-Präzision geprüft, inwieweit die erhobenen Ergebnisse voneinander abweichen. Für diesen Zweck wurde das humane WHO-Tuberkulin gegen das bovine WHO-Tuberkulin getestet, um mit zwei Referenztuberkulinen zu arbeiten, deren Wirksamkeit bekannt ist. In Abbildung 21 ist gezeigt, dass die kalkulierten Konfidenzintervalle innerhalb einer Meerschweinchengruppe jeweils in einem engen Bereich liegen und das Konfidenzintervall innerhalb einer Gruppe mit dem der nächsten Gruppe in weiten Bereichen überlappt. Außerdem zeigt die jeweilige Mittellinie der Boxplots den ermittelten Wirksamkeitsschätzer für das humane WHO-Tuberkulin an. Dieser liegt in allen vier Experimenten zwischen 1590 und 882 IE/mL. Der geometrische Variationskoeffizient über die vier Experimente liegt bei 22 % (Siehe Abschnitt 6.4).

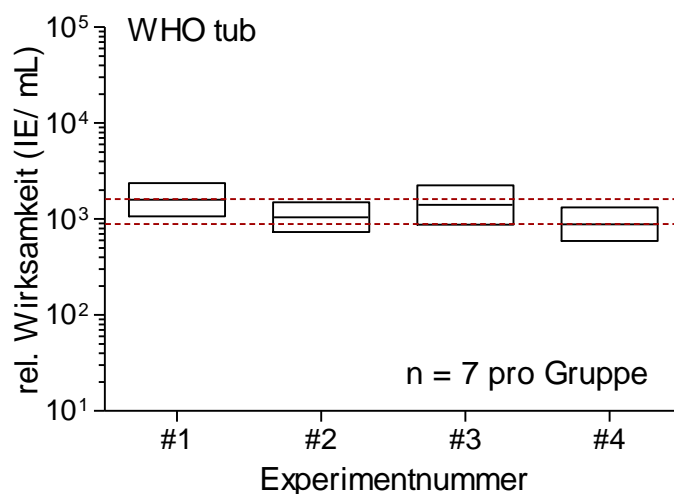


Abbildung 21: Die mittels T ϕ -Proliferations-Assays ermittelten Wirksamkeitsschätzer liegen bei mehrmaliger Wiederholung des Tests in einem sehr engen Bereich. Die Inter-Assay-Präzisions-Prüfung wurde durch viermalige Wiederholung des T ϕ -Proliferations-Assays mit humanem WHO-Referenztuberkulin in mit *Mycobacterium bovis*-Stamm AN5 sensibilisierten Meerschweinchen durchgeführt. Dabei zeigt die Ordinate die kalkulierte Wirksamkeit des humanen Tuberkulins und die Abszisse die vier Experimentwiederholungen. Die mittlere Linie jedes Boxplots steht für die ermittelte Wirksamkeit; die obere und die untere Linie geben das Konfidenzintervall an. Die beiden gestrichelten Linien schließen zur visuellen Verdeutlichung den Bereich ein, innerhalb dessen die ermittelten Wirksamkeitswerte liegen.

7.2.6. Der T ϕ -Proliferations-Assay ermittelt gleiche Wirksamkeitsschätzer wie der Tuberkulin-Hauttest

Um eine neue Methode einzuführen, muss bewiesen sein, dass sie mit der alten, bestehenden Methode vergleichbar ist. Für diesen Vergleich wurden der TST parallel zum neu etablierten T ϕ -Proliferations-Assay durchgeführt. Abbildung 22 zeigt das parallele Durchführen beider Methoden viermal in Folge mit unterschiedlichen Meerschweinchengruppen, aber jedes Mal mit dem humanen WHO-Referenztuberkulin. Mit beiden Methoden konnte ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden.

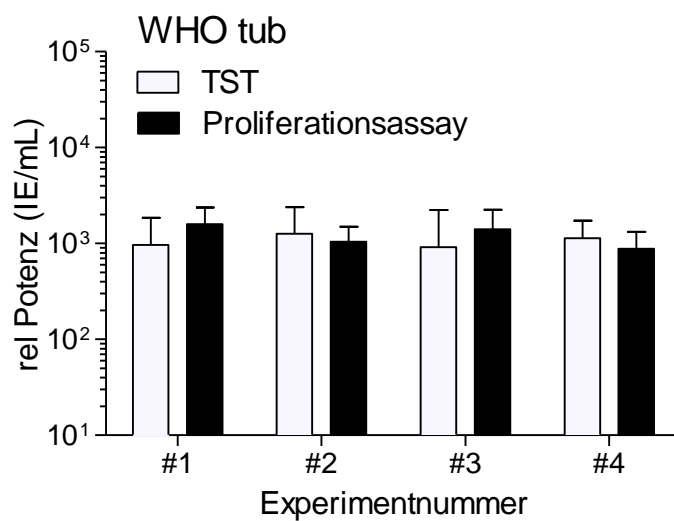


Abbildung 22: Der T ϕ -Proliferations-Assay erzielt ähnliche Wirksamkeitsschätzer wie der Tuberkulin-Hauttest. Die Prüfung der Vergleichbarkeit von T ϕ -Proliferations-Assay und Tuberkulin-Hauttest wurde durch viermalige Wiederholung des T ϕ -Proliferations-Assays mit humanem WHO-Referenztuberkulin in mit *Mycobacterium bovis*-Stamm AN5 sensibilisierten Meerschweinchen durchgeführt. Auf der Ordinate ist die ermittelte relative Wirksamkeit in IE/mL angezeigt und die Abszisse zeigt vier Wiederholungsexperimente, in denen jeweils beide Methoden parallel durchgeführt wurden. Die weißen Balken symbolisieren die Ergebnisse der Tuberkulin-Hauttests; die schwarzen Balken repräsentieren die ermittelten Potenzen des T ϕ -Proliferations-Assays. Die Fehlerbalken zeigen das 95 % Konfidenzintervall über die Gruppe in der jeweiligen Methode.

Zusätzlich wurden verschiedene Rindertuberkulinchargen in beiden Methoden parallel durchgeführt (Siehe Abbildung 23). Dabei wurden je vier Chargen von drei verschiedenen Herstellern geprüft. Bei den bovinen Tuberkulinchargen zeigte sich, dass der T ϕ -Proliferations-Assay die Potenz der Tuberkuline im Vergleich zum TST systematisch überschätzt. Das galt für alle zwölf getesteten Chargen von insgesamt drei verschiedenen Herstellern. Die von den Herstellern zur Verfügung gestellten Tuberkuline waren bereits vom Hersteller getestet. Anhand der Herstellerangaben wurden die Tuberkuline jeweils auf die gleiche nominelle Wirksamkeit eingestellt und wie unter 6.1 und 6.2 beschrieben im TST bzw. parallel im T ϕ -Proliferations-Assay eingesetzt. Dabei waren die zur Verfügung gestellten Tuberkulinchargen von Hersteller I mit 50.000 IE/mL und die von Hersteller III mit 30.000 IE/mL angegeben worden. Die zur Verfügung gestellten Chargen von Hersteller II wurden mit unterschiedlichen Potenzen angegeben, wobei diese Chargen zwischen 20.205 IE/mL und 23.333 IE/mL variierten (Siehe Tabelle 8).

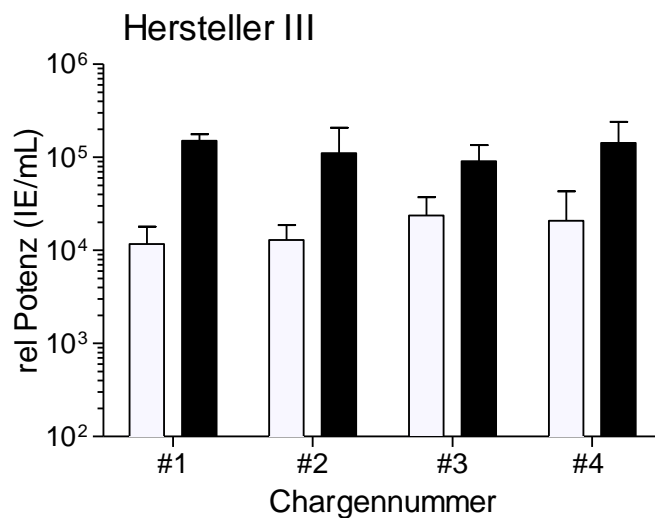
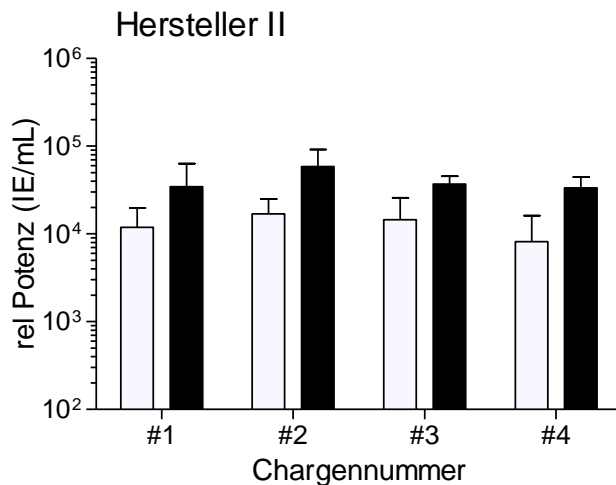
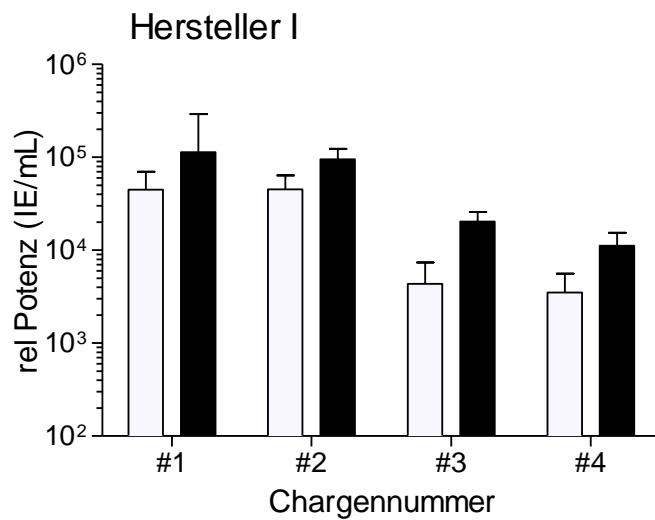


Abbildung 23: Im Herstellervergleich ermittelt der T ϕ -Proliferations-Assay höhere Potenzschätzer verglichen zum Tuberkulin-Hauttest. Verschiedene bovine Chargen von verschiedenen Herstellern wurden parallel sowohl im TST als auch im T ϕ -Proliferations-Assay getestet. Die Ordinaten zeigen die ermittelte relative Potenz in IE/mL und die Abszisse je vier Chargen. Die weißen Balken symbolisieren die Ergebnisse der Tuberkulin-Hauttests; die schwarzen Balken repräsentieren die ermittelten Potenzen des T ϕ -Proliferations-Assays. Die Fehlerbalken stellen das 95 % Konfidenzintervall über die Gruppe einer jeden Methode dar.

Tabelle 8: Vier bovine Tuberkulinchargen von drei Herstellern mit ihrer angegebenen Wirksamkeit und den Ergebnissen im TST und T ϕ -Proliferations-Assay

Hersteller	Charge	angegebene Wirksamkeit (IE/mL)	ermittelte Wirksamkeit im TST (IE/mL)	ermittelte Wirksam- keit im T ϕ - Proliferations- Assay (IE/mL)
I	#1	50.000	44.884	113.181
	#2	50.000	45.100	94.998
	#3	50.000	4.362	20.389
	#4	50.000	3.521	11.186
II	#1	23.233	11.850	34.423
	#2	20.205	8.175	33.382
	#3	21.279	16.882	58.441
	#4	22.402	14.531	37.066
III	#1	30.000	11.685	151.294
	#2	30.000	12.911	111.308
	#3	30.000	23.736	91.192
	#4	30.000	20.878	142.851

Die systematische Überschätzung der Wirksamkeit wird durch die Bildung des Verhältnisses zwischen dem Ergebnis des T ϕ -Proliferations-Assay und des TST erkennbar. Dabei wurden für jeden Hersteller bei allen vier Chargen die Ergebnisse des T ϕ -Proliferations-Assays durch die Ergebnisse des TST dividiert, um einen Faktor zu erhalten, um den jeweils der Proliferations-test höher liegt verglichen zum TST. Im Mittel liegt dieser Index für Hersteller I bei 3,12, für Hersteller II bei 3,25 und für Hersteller III bei 8,06. (Siehe Abbildung 24).

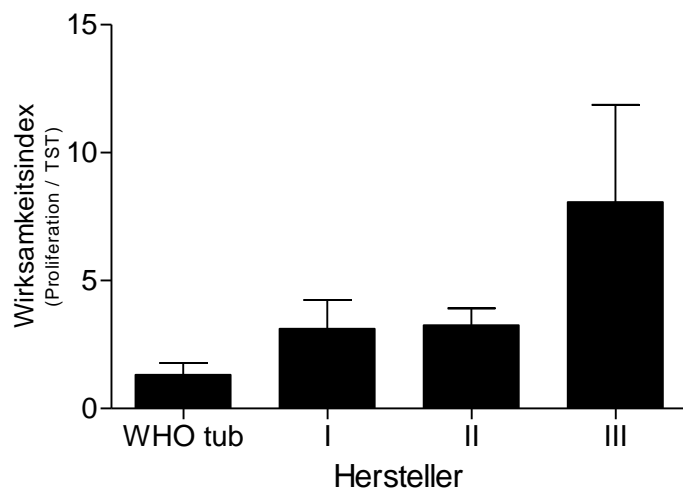


Abbildung 24: Die in beiden Methoden getesteten Chargen offenbarten einen für den jeweiligen Hersteller spezifischen Faktor, um den der T ϕ -Proliferations-Assay die Wirksamkeit einer Charge höher bewertet als der TST. Die Ordinate zeigt den Wirksamkeitsindex, der durch Division der Ergebnisse des T ϕ -Proliferations-Assay durch die Ergebnisse des Tuberkulin-Hauttests kalkuliert wurde. Die Abszisse zeigt links den Faktor für das humane WHO-Tuberkulin und die Hersteller I-III. Die Balken symbolisieren denjenigen Faktor, um den bei Testung der Tuberkuline in beiden Methoden der T ϕ -Proliferations-Assay höher liegt, verglichen zum Tuberkulin-Hauttest. Die Fehlerbalken stellen dabei die Standardabweichung über die vier Experimente je Hersteller (Siehe Abbildung 23) dar.

In Abbildung 25 sind die in beiden Methoden ermittelten Potenzen in Korrelation zueinander dargestellt, wobei die Winkelhalbierende das Optimum der Datenpunkte anzeigen würde. Das Optimum bedeutet, dass die Ergebnisse für jede Charge parallel in beiden Methoden ermittelt zu 100 % übereinstimmen würden. Bei Berechnung des Bestimmtheitsmaßes ergibt sich zunächst eine Übereinstimmung beider Methoden von 66,1 %.

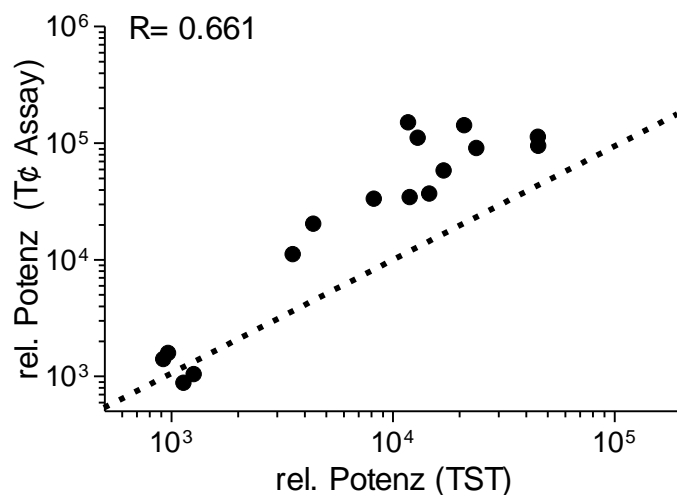


Abbildung 25: Obwohl der Tϕ-Proliferations-Assay die Potenzen der Testchargen höher schätzt als der Tuberkulin-Hauttest, korrelieren beide Methoden sehr gut miteinander. Die Korrelation zwischen Tϕ-Proliferations-Assay und TST liegt bei 66,1 %. Verschiedene bovine Chargen von verschiedenen Herstellern wurden parallel sowohl im TST als auch im Tϕ-Proliferations-Assay durchgeführt. Auf der Ordinate ist die ermittelte relative Potenz des Tϕ-Proliferations-Assays aufgetragen; auf der Abszisse die ermittelte relative Potenz des TST. Die Winkelhalbierende stellt diejenige Linie dar, bei der die beiden Methoden zu 100 % miteinander übereinstimmen würden. Jeder Punkt steht für eine in beiden Methoden getestete Charge.

Werden die Ergebnisse des T ϕ -Proliferations-Assays um die für in Abbildung 24 ermittelten Hersteller-spezifischen Faktoren korrigiert, lässt sich die Übereinstimmung auf über 90 % steigern. (Siehe Abbildung 26).

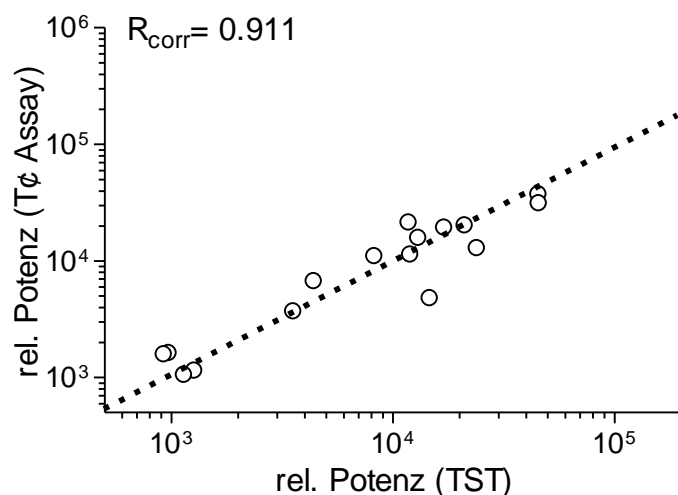


Abbildung 26: Unter Berücksichtigung des herstellerspezifischen Korrekturfaktors lässt sich die Korrelation beider Methoden zueinander auf 90 % steigern. Auf der Ordinate ist die ermittelte relative Potenz des T ϕ -Proliferations-Assays aufgetragen; auf der Abszisse die ermittelte relative Potenz des TST. Die Winkelhalbierende stellt diejenige Linie dar, bei der die beiden Methoden zu 100 % miteinander übereinstimmen würden. Jeder Punkt steht für eine in beiden Methoden getestete Charge.

Um die Präzision des Testes abschätzen zu können, wurde der geometrische Variationskoeffizient berechnet. Der T ϕ -Proliferations-Assay variiert bei der Wiederfindung eines Ergebnisses um 26 %, der TST um 14 %. Damit zeigte sich der Hauttest über diese vier Wiederholungsexperimenten als etwas reproduzierbarer. Wenn hingegen die Einzelergebnisse der Tiere innerhalb der 16 durchgeführten Assays verglichen wurden, variierte der T ϕ -Proliferations-Assay um 56 % verglichen zu 75 % Variation des TST. Vergleicht man nur die 12 durchgeführten Versuche mit den je vier Chargen von drei Herstellern, beträgt die Variation bei beiden Testsystemen 53 % (Siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Variationskoeffizienten beider Testsysteme

		TST		T ϕ -Proliferations-Assay	
	Charge	Geomittel vom LN des Schätzwertes	Variationskoeffizient	Geomittel vom LN des Schätzwertes	Variationskoeffizient
Hersteller I	1	10,78	0,50	11,66	1,13
	2	11,02	0,34	11,46	0,33
	3	0,00	0,44	10,14	0,35
	4	8,15	0,54	9,45	0,54
Hersteller II	1	9,22	0,46	10,48	0,77
	2	9,25	0,41	11,04	0,31
	3	9,74	0,43	10,97	0,37
	4	9,56	0,87	10,54	0,30
Hersteller III	1	9,76	0,47	11,6	0,76
	2	10,05	0,57	11,6	0,43
	3	9,99	0,99	11,47	0,86
	4	9,11	0,31	10,04	0,27
Reproduzierbarkeitsexperimente mit WHO hum	1	6,78	2,07	7,36	0,57
	2	6,97	0,97	6,78	0,65
	3	5,37	1,60	6,47	0,86
	4	7,07	1,10	6,77	0,51
	MW (V) (16 Versuche		0,75		0,56
	MW (V) Repro (4 Versuche)		1,44		0,65
	MW (V) Herstellerversuche (12)		0,53		0,53

7.2.7. Lipidantigene zeigen im Proliferationsassay eine höhere Reaktogenität als im Hauttest

Da es sich bei Tuberkulinen um Antigenpräparationen aus mykobakteriellen Kulturen handelt, ist die präzise Antigenzusammensetzung einer jeden Charge mit herkömmlichen molekularbiologischen Verfahren bisher noch nicht zuverlässig möglich [14,29]. Basierend auf einer Hypersensitivitätsreaktion Typ IV wird im Tuberkulin-Hauttest eine gegen mykobakterielle Antigene gerichtete T-Zell-Antwort ausgelöst und quantifiziert. Auch in der alternativ etablierten Methode des T ϕ -Proliferations-Assays werden jene T-Zellen abgerufen, um die Antwort auf mykobakterielle Antigene zu quantifizieren. Es gab Vorerkenntnisse, dass Lipidbestandteile von Mykobakterien T-Zell-Antworten auslösen [81]. Um die Frage zu klären, ob beide Methoden vergleichbare T-Zell-Antworten auf die verschiedenen mykobakteriellen Antigenstrukturfamilien (Proteine, Peptide, Lipopeptide, Lipide, Glykolipide aus der mykobakteriellen Zellwand) quantifizieren, wurde eine definierte Menge Total-Lipid vom BCG-Stamm unter Verwendung von mit hitze-inaktiviertem *Mycobacterium bovis*-Stamm AN5 sensibilisierten Meerschweinchen parallel in beiden Methoden geprüft. Beim Total-Lipid handelt es sich ebenso um ein mykobakterielles Antigengemisch, allerdings um ein Chloroform-Methanol-Extrakt einer BCG-Kultur. Das bedeutet, im Total-Lipid sind nur diejenigen mykobakteriellen Antigene enthalten, die in Chloroform und Methanol löslich sind. Demnach handelt es sich primär um mykobakterielle Lipide aus der Zellwand der BCG-Bakterien. In *in vitro*-Vorversuchen wurde die Konzentration bestimmt, bei der das Total-Lipid die gleiche Reaktivität *ex vivo* im T ϕ -Proliferations-Assays auslöst wie 30 IE/mL Tuberkulin. Anhand dessen wurde anschließend Tuberkulin gegen das Total-Lipid parallel in beiden Methoden miteinander verglichen, wobei das Total-Lipid in beiden Fällen nominell gleich eingesetzt wurde. Abbildung 27 zeigt den Vergleich von T ϕ -Proliferations-Assay (Abbildung 27 A) und Tuberkulin-Hauttest (Abbildung 27 B) bei der Quantifizierung der T-Zell-Antwort auf Total-Lipid BCG in AN5-sensibilisierten Meerschweinchen. Bei Betrachtung der Ergebnisse ermittelt durch den T ϕ -Proliferations-Assay ist zu erkennen, dass die Intensität der T-Zell-Antwort auf das Total-Lipid BCG annähernd der auf das bovine WHO-Referenztuberkulin gleicht. Bei Betrachtung der Ergebnisse ermittelt durch den Tuberkulin-Hauttest ist zu erkennen, dass die Reaktion auf das Total-Lipid BCG deutlich unter der Reaktionsintensität auf das bovine WHO-Referenztuberkulin liegt.

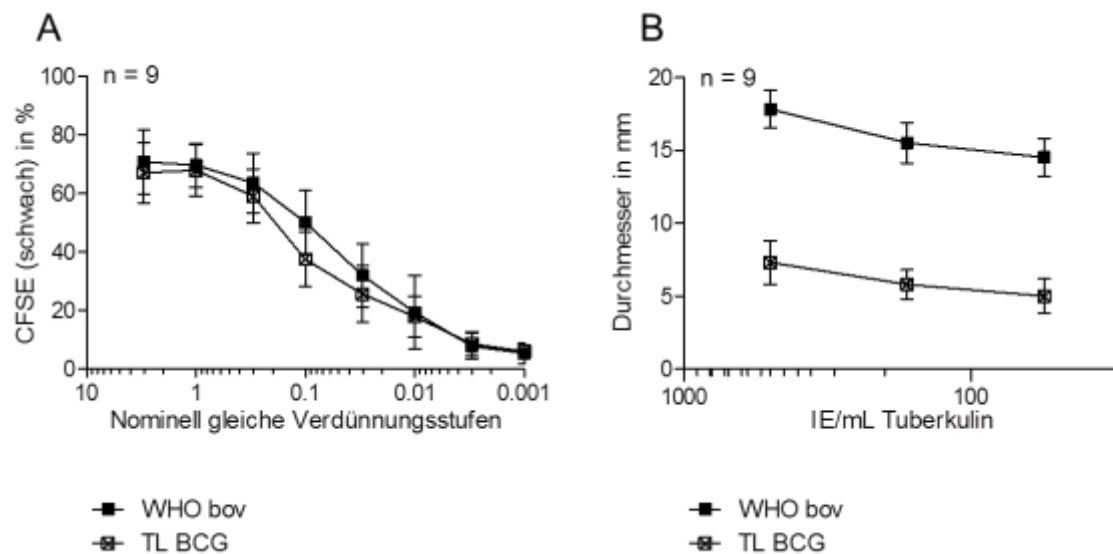


Abbildung 27: Der T ϕ -Proliferations-Assay detektiert vor allem mykobakterielle Lipidstrukturen, wohingegen der Tuberkulin-Hauttest auf Proteinantigene zu reagieren scheint. Abbildung 27 A zeigt vergleichend die Dosis-Wirkungs-Kurven für das bovine WHO-Tuberkulin und das Total-Lipid BCG im T ϕ -Proliferations-Assay; in Abbildung 27 B sind die Dosis-Wirkungs-Kurven für das bovine WHO-Tuberkulin und vergleichend dazu vom Total-Lipid BCG im Tuberkulin-Hauttest gezeigt. Im T ϕ -Proliferations-Assay darstellenden Diagramm zeigt die Ordinate die als CFSE-schwach definierten Zellen in Prozent und die Abszisse die *ex vivo* eingesetzte Konzentration vom Tuberkulin bzw. Total-Lipid. Im Diagramm rechts zeigt die Ordinate den auf der Haut der Meerschweinchen abgemessenen Durchmesser der induzierten Läsionen in Millimeter und die Abszisse die Konzentration der intradermal injizierten Testansätze. In beiden Diagrammen symbolisiert das schwarze Quadrat die Daten für das WHO-Tuberkulin, die leeren Quadrate für das in beiden Methoden getestete Total-Lipid BCG. Die Fehlerbalken zeigen die gemittelte Standardabweichung über neun Tiere in dieser Versuchsgruppe.

7.3. Die rekombinant exprimierten Meerschweinchenzytokine steigern die CD1-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten

In Abschnitt 7.2.7 wurde nicht nur gezeigt, dass der T ϕ -Proliferations-Assay mykobakterielle Lipidantigene sensitiver detektiert als der Tuberkulin-Hauttest. Es wurde gleichzeitig gezeigt, dass mit mykobakteriellen Lipidantigenpräparationen wie dem Total-Lipid in mykobakteriell sensibilisierten Meerschweinchen *ex vivo* eine vergleichbar starke Immunantwort induziert werden kann wie mit dem WHO-Standard-Tuberkulin (Siehe Abbildung 27 A). Damit konnten andere Publikationen [23,79], in denen der Zusammenhang zwischen mykobakteriellen Lipiden und einer entsprechenden Immunantwort im Meerschweinchen dargestellt wurde, untermauert werden und gefolgert werden, dass mykobakterielle Lipidantigene eine relevante Rolle in der induzierten Immunreaktion des Meerschweinchens spielen. Wie in Abschnitt 5.3 beschrieben, werden Lipidantigene aufgrund ihrer chemischen Konformation nicht von MHC-Molekülen präsentiert, sondern von CD1-Molekülen, deren Bindungsgrube räumlich in der Lage ist, die langkettigen, hydrophoben Kohlenwasserstoffreste der Lipide zu binden bzw. an T-Zellen zu präsentieren [24,78,85].

In Anlehnung an etablierte Protokolle für humane Zellen war es Ziel, Meerschweinchen-Monozyten mittels rekombinanten gpGM-CSF und gpIL4 zu CD1-exprimierenden APCs *ex vivo* zu differenzieren. Da die benötigten Meerschweinchenzytokine kommerziell nicht erhältlich sind, mussten diese zunächst, wie in Abschnitt 6.6 dargestellt, rekombinant exprimiert werden. Dazu wurden die Gene für Meerschweinchen GM-CSF und IL4 mittels *Reverse Transkriptase-PCR* von aus Meerschweinchen-PBMCs isolierter RNA amplifiziert, in einen T-Vektor kloniert und sequenziert. Die überprüften Konstrukte wurden anschließend in den eukaryontischen *packaging Vektor* pMYC ligiert. Durch Transfektion einer geeigneten Zelllinie, die das MMLV-Glykoprotein konstitutiv exprimiert, wurden Partikel gebildet, mittels derer die murine Pre-B Zelllinie 38B9 transduziert werden konnte. Transduzierte Zellen wurden mittels Grenzverdünnung vereinzelt. Anhand der Fluoreszenz des gleichzeitig über eine IRES-site exprimierten GFP-Markers wurde sichergestellt, dass die zur Produktion von Zytokinüberständen verwendeten Zelllinien zu 100% transduziert waren (Siehe Abbildung 28).

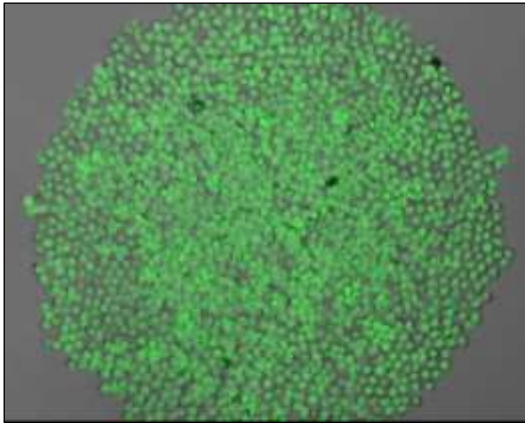


Abbildung 28: Anhand des grün fluoreszierenden Reporterproteins GFP konnten erfolgreich transduzierte 38B9-Zellen mikroskopisch visualisiert werden. Mittels Grenzverdünnung konnten stabile Zellkulturen etabliert werden, die rekombinantes gpGM-CSF und gpIL4 sezernieren. Die Überstände der erfolgreich transduzierten 38B9-Zellen konnten für die *ex vivo* Differenzierung von Monozyten zu professionellen antigen-präsentierenden Zellen genutzt werden.

Der Überstand sowohl von mit gpGM-CSF und mit gpIL4 stabil transduzierter 38B9-Zellkulturen wurde in Vorexperimenten titriert (Daten nicht gezeigt), um dasjenige Pipettier-volumen zu ermitteln, das für eine optimale *ex vivo* Differenzierung von Meerschweinchen-monozyten zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen notwendig ist. Anschließend wurde versucht Meerschweinchenmonozyten unter Nutzung von Plastikadhärenz in einer 6-Kavitäten-Platte aus der PBMC-Suspension in Anlehnung an Protokolle über die Generierung von humanen Dendritischen Zellen zu separieren. Die restlichen, nicht adhären-ten Suspensionszellen wurden abgenommen und separat kultiviert. Die Monozyten wurden mit rekombinanten gpGM-CSF und gpIL4 in SF-IMDM und 5 % autologem Serum für 24 h stimu-liert und anschließend mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich der CD1-Expression analy-siert (Abbildung 29).

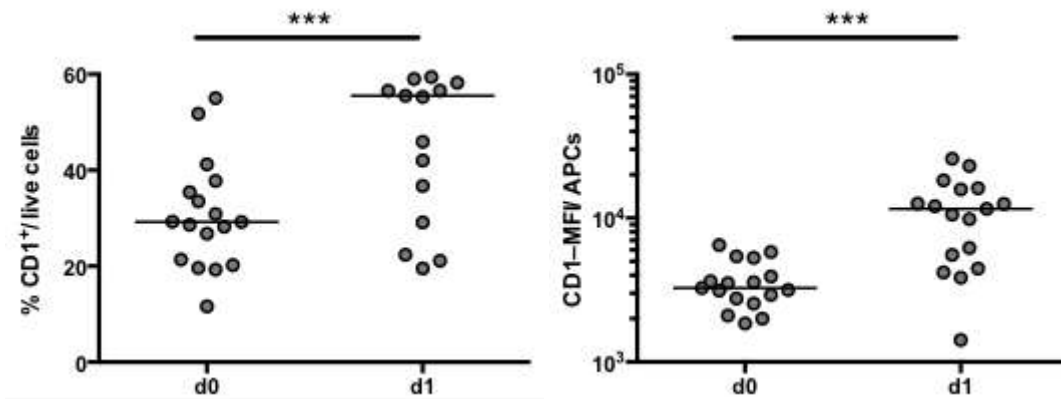


Abbildung 29: Nach 24 h *in vitro* Stimulation mit gpGM-CSF und gpIL4 steigt die CD1-Expression auf von Monozyten abgeleitete antigenpräsentierenden Zellen. (A) Die Ordinate zeigt den prozentualen Anteil an CD1-positiv definierten Zellen innerhalb der antigenpräsentierenden Zellpopulation. Die Abszisse zeigt die Färbung vergleichend an Tag 0 und Tag 1. Die Färbung erfolgte in Unikaten. (B) Die Ordinate zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität der mit α CD1-Antikörper gefärbten APCs. Die Abszisse zeigt die Färbung vergleichend an Tag 0 und Tag 1. Die Färbung erfolgte in Unikaten.

Innerhalb der als antigenpräsentierenden Zellen im Forward-Side-Scatter-Plot definierten Zellpopulation konnte eine signifikante Steigerung in der CD1-Expression auf der Oberfläche der Zellen detektiert werden.

Die CD1-Expression, die aus der Stimulation von Monozyten mit rekombinanten gpGM-CSF und gpIL4 resultiert, konnte reproduzierbar in unterschiedlichen Meerschweinindividuen induziert werden (Siehe Abbildung 30).

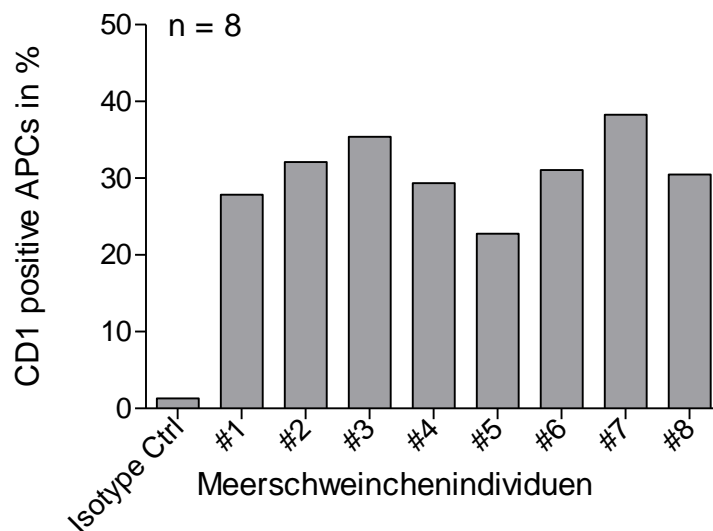


Abbildung 30: Die Steigerung der CD1-Expression auf durch Plastikadhärenz angereicherten Monozyten konnte zuverlässig auf Zellen von Dunkin-Hartley-Meerschweinchen nach 24-stündiger Zytokinstimulation gemessen werden. Die Ordinate zeigt die als CD1-positiven definierten APCs. Die Abszisse vergleicht die CD1-Färbung von acht Meerschweinindividuen 24 h nach Zytokinstimulation.

7.3.1. Der Lipid-Stimulations-Assay detektiert antigenspezifische T-Zell-Antworten

Zur Abklärung der Frage, ob Meerschweinchen auf mykobakterielle Lipidantigene reagieren, wurde basierend auf dem in 6.2 beschriebenen *ex vivo* T ϕ -Proliferations-Assays der Lipid-Stimulations-Assay etabliert. Zur Etablierung eines Assays, mit dessen Hilfe besonders die immunologische Relevanz von CD1-restringierten mykobakteriellen Lipidantigenen studiert werden kann, wurden zunächst CD1-positive Zellen für eine adäquate Antigenpräsentation *in vitro* benötigt. Dafür wurden verschiedene Protokolle von murinen Knochenmarkszellen bzw. von der *in vitro* Differenzierung von humanen Monozyten zu APCs ausprobiert und ans Meerschweinchensystem angepasst (Siehe Abschnitt 6.7 und 7.3).

Von Untersuchungen an humanen Zellen ist bekannt, dass die mykobakteriellen Antigene ManLAM, GMM und PIM eine CD1-restringierte T-Zell-Antwort induzieren [23,79,86]. Antigenpräsentierende Zellen wie z.B. Dendritische Zellen exprimieren das CD1-Molekül und tragen es auf ihrer Zelloberfläche. Zytokine wie GM-CSF und IL4 stimulieren die CD1-Expression und die Proliferation CD1-exprimierender Zellen. Um zu zeigen, dass Meerschweinchen genau wie der Mensch spezifische T-Zell-Antworten auf definierte mykobakterielle Antigene, wie ManLAM, GMM und PIM nach entsprechender Sensibilisierung geben können, wurden sieben naive Meerschweinchen und 29 mykobakteriell sensibilisierte Meer-

schweinchen hinsichtlich ihrer Immunantwort auf eben jene Antigene miteinander verglichen. Den Tieren wurde jeweils Blut entnommen, welches über Ficollgradientenzentrifugation aufgereinigt wurde. Die daraus gewonnenen PBMCs wurden für eine Stunde zur Adhärenz gebracht, um Monozyten von restlichen PBMCs zu trennen. Die nicht adhärenen Suspensionzellen wurden abgenommen und separat kultiviert, während die Monozyten für 24 h mit rekombinanten gpGM-CSF und gpIL4 stimuliert wurden. Am Tag nach der Blutentnahme wurden die Zellen mit CFSE gefärbt und im Lipid-Stimulations-Assay mit den Antigenen stimuliert und für fünf Tage kultiviert. Die Analyse der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. In Abbildung 31 ist gezeigt, dass naive Tiere keinerlei Reaktion auf die Stimulation mit mykobakteriellen Antigenen zeigten, wohingegen die Stimulation mit den Antigenen ManLAM, GMM und PIM bei den 29 getesteten, sensibilisierten Meerschweinchen, verglichen zur unstimulierten Mediumskontrolle, eine signifikante Proliferationssteigerung bewirkten.

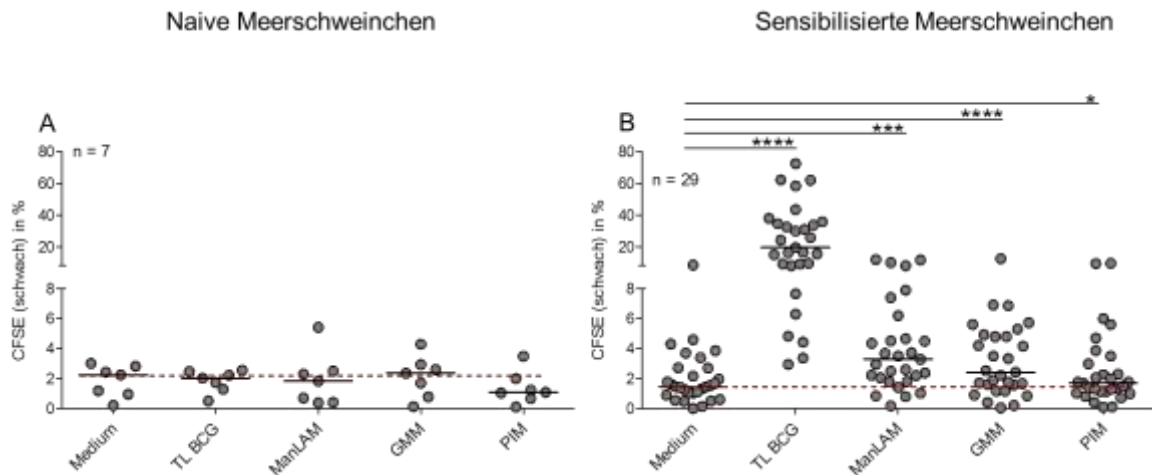


Abbildung 31: Nach der Sensibilisierung ist eine CD1-restringierte T-Zell-Antwort auf mykobakterielle Lipidantigene im Meerschweinchen *ex vivo* induzierbar. Für den Lipid-Stimulations-Assay wurden Meerschweinchen an Tag 0 (A) und an Tag 30 nach der Sensibilisierung mit dem *Mycobacterium bovis*-Stamm AN5 (B) narkotisiert, Blut entnommen und CD1-positiven antigenpräsentierenden Zellen *in vitro* generiert. Auf der Ordinate sind je die als CFSE-schwach definierten Zellen in % angegeben. Die Abszisse zeigt die unterschiedlichen Antigenansätze. Jeder Punkt steht für ein Meerschweinchen. Die horizontalen Balken repräsentieren den Median über alle Tiere im jeweiligen Testansatz. Die rot gestrichelte Linie verlängert den Median der Mediumskontrolle, um die Signifikanz der Daten deutlicher zu visualisieren. Auch CD1-restringierte T-Zell-Antworten sind nur nach vorhergegangener Sensibilisierung abrufbar (B). Naive Meerschweinchen (A) zeigen keine Immunantwort auf mykobakterielle Lipidantigene.

Um die Relevanz der CD1-positiven APCs für die Stimulation der T-Zellen mit Lipiden zu untersuchen, wurden im Lipid-Stimulations-Assay doppelte Ansätze von acht sensibilisierten Meerschweinchen gemacht, in denen das Total-Lipid BCG, ManLAM, GMM und PIM getestet wurden. Ein Ansatz testete diese Antigene ohne die Zugabe CD1-positiver Zellen und der andere Ansatz testete diese Antigene mit Zugabe jener antigenpräsentierender Zellen (Siehe Abbildung 32).

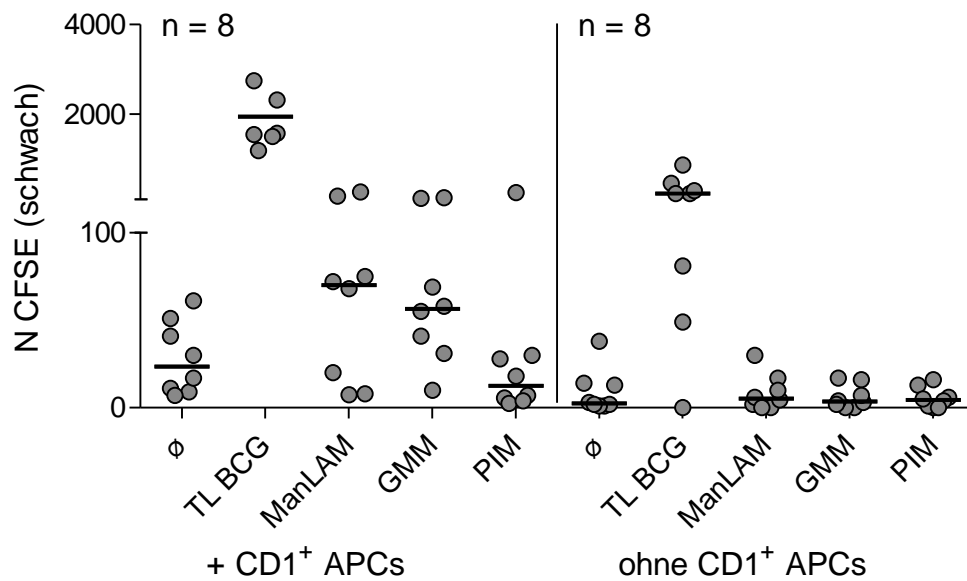


Abbildung 32: Die Anwesenheit von CD1-positiven antigenpräsentierenden Zellen ist essentiell für die Quantifizierung der *ex vivo* Immunantwort auf mykobakterielle Lipidantigene. An Tag 30 nach der Sensibilisierung wurde Blut genommen, PBMCs zur Adhärenz gebracht und mit gpZytokinen stimuliert. 24 h später wurde ein Lipid-Stimulations-Assay angesetzt aus PBMCs von selben Meerschweinindividuen einmal mit und einmal ohne autologe APCs. Auf der Ordinate sind die auf Stimulation reagierenden Zellen *in toto* aufgetragen. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Stimulationsansätze einmal mit Zugabe von CD1-positiven APCs (links) und einmal ohne CD1-positive APCs im System. Jeder Punkt symbolisiert ein Meerschweinchenindividuum. Die horizontalen Balken symbolisieren den Median über die Gruppe im jeweiligen Testansatz.

Aus dem Diagramm geht hervor, dass eine messbare T-Zell-Antwort nur durch Zugabe CD1-positiver Zellen *in vitro* induzierbar ist (linke Seite der Abbildung), wohingegen keine messbare T-Zell-Antwort in sensibilisierten Meerschweinchen zu verzeichnen ist, wenn diesen T-Zellen diese Antigene nicht präsentiert werden (rechte Seite von Abbildung 32). Indirekt wird daraus geschlossen, dass die Lipidantigene nur von professionellen APCs - vermutlich über CD1 - präsentiert werden.

8. Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurde dargelegt, wie eine alternative Methode zur staatlich geforderten Chargenprüfung von bovinem Tuberkulin in Übereinstimmung mit dem 3R-Konzept von Russel und Burch erfolgreich etabliert wurde. Die *ex vivo-Methode* sollte das Potential haben, jedem Meerschweinchenindividuum innerhalb der Experimentendauer Leid und Belastung zu ersparen (**R**efinement). Weitere Ziele waren es Tierzahlen zu verringern (**R**eduction) und den belastendsten Teil des Tierexperiments – den Tuberkulin-Hauttest – vollständig zu ersetzen (**R**eplacement).

Zusätzlich wurde ein auf der Alternativmethode basierender, optimierter Lipid-Stimulations-Assay etabliert, mit Hilfe dessen untersucht werden sollte, ob Meerschweinchen ebenso wie der Mensch auf CD1-restringierte, mykobakterielle Lipidantigene mit einer antigenspezifischen T-Zell-Antwort reagieren. Damit sollte das Meerschweinchen als Modellorganismus für Studien an CD1-restringierten T-Zell-Antworten hinsichtlich mykobakterieller Lipidantigene zugänglich gemacht werden.

8.1. Der T_C-Proliferations-Assay kann den schwach reproduzierbaren TST bei der Chargenprüfung ablösen

Die Wirksamkeit jeder Tuberkulincharge muss bekannt sein, damit der Hersteller die Charge so einstellen kann, dass für den diagnostischen Test am Tier die richtige Dosis verabreicht werden kann. Zu niedrig eingestellte Chargen hätten falsch negative Ergebnisse zur Folge, so dass eine mutmaßliche Tuberkuloseinfektion des Rindes unerkannt bliebe. Eine zu hoch eingestellte Charge würde bei einem infizierten Rind eventuell aufbrechende, eiternde und schmerzhaft, nekrotische Läsionen erzeugen und bei einem nicht infizierten Tier ein falsch positives Ergebnis liefern.

Der Tuberkulin-Hauttest basiert auf einer Typ IV Hypersensitivitätsreaktion, also einer Reaktion vom verzögerten Typ. Die Hautreaktion stellt eine „Recall-Antwort“ dar, die nur nach vorangegangener Sensibilisierung induzierbar ist [54]. Basierend auf der Hypersensitivitätsreaktion Typ IV wird im TST eine Hautrötung induziert, die auf der Migration von antigenspezifischen T-Zellen zur Injektionsstelle von im Tuberkulin enthaltenen mykobakteriellen Antigenen beruht. An der Injektionsstelle sezernieren diese T-Zellen inflammatorische Zytokine, die die Rötung verursachen oder gar zu nekrotischen Läsionen führen können. Bei der Chargenprüfung von Tuberkulinen wird beim Meerschweinchen im TST jene Rötung mittels Lineal ausgemessen, quantifiziert und so die Wirksamkeit des Präparats ermittelt.

Der TST in der Chargenprüfung ist trotz großer Bemühungen um Standardisierung nur schlecht reproduzierbar. Die Folge sind Versuchswiederholungen, die bezüglich der Meerschweinchenutzung aus ethischen Gründen und bezüglich des Personals aus wirtschaftlichen Gründen vermieden werden sollten. Ein weiterer Nachteil des TST ist die nötige vorausgehende Sensibilisierung der Meerschweinchen, die laut Monografie 01/2008:0536 des *Europäischen Arzneibuchs* mit lebenden Bakterien des virulenten *Mycobacterium bovis*-Stamms AN5 durchgeführt werden soll [7]. Das erfordert in Deutschland eine S3-Tiereinheit, stellt für die Tiere eine letale Infektion und ein Gesundheitsrisiko für die Belegschaft dar. Hinzukommender und größter Nachteil für die Versuchstiere sind die Rasur der Meerschweinchenflanken und die insgesamt zwölf intradermalen Injektionen, die schmerzende Läsionen mit sich bringen können.

Bei der Suche nach einem alternativen Endpunkt zur Hautablesung standen die Kriterien Objektivität und damit einhergehende höhere Präzision und die Bedingungen des 3R-Konzepts im Vordergrund. Daraufhin wurde basierend auf Konzepten aus den 1980er Jahren [17] die Messung einer T-Zell-Antwort als adäquater Endpunkt für den neuen Assay ausgewählt, da auch die Hautreaktion basierend auf einer Typ IV-Reaktion von langlebigen T-Gedächtniszellen mit hoher proliferativen Kapazität abhängig ist.

Bei der Durchführung der Chargenprüfung wurde das Meerschweinchenmodell gewählt, weil es nach einer erfolgreichen Mykobakterieninfektion einen ähnlichen Krankheitsverlauf zum Menschen und zum Rind entwickelt [8,87]. Zusätzlich ist das Meerschweinchen im Vergleich zur Maus natürlich empfänglich für Mykobakterien.

Die beim TST abgerufene T-Zell-Antwort kann mit heutiger Technik auch *ex vivo* quantifiziert werden. Darauf basiert der in dieser Arbeit etablierte T ϕ -Proliferations-Assay. Nach der Sensibilisierung entwickeln sich antigen-spezifische T-Gedächtniszellen, die im Blutkreislauf zirkulieren und die man mittels Blutentnahme aus dem sensibilisierten Tier isolieren kann. Stimuliert man diese Zellen *ex vivo* mit mykobakteriellen Antigenen, die diese T-Zellen erkennen können, beginnen diese zu proliferieren, was im Durchflusszytometer messbar ist. Außerdem sezernieren sie inflammatorische Zytokine wie z.B. IFN γ oder TNF α , was theoretisch mittels ELISA messbar ist. Der hier etablierte Assay sollte aus Praktikabilitätsgründen auf der Messung von T-Zell-Proliferation beruhen, da keine Reagenzien zur Etablierung eines für Meerschweinchen spezifischen IFN γ -ELISAs zur Verfügung standen.

8.2. Ein CFSE-basierter Proliferationsassay ermöglicht weitergehende Studien an antigenspezifischen T-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass die CFSE-Färbung als Proliferationsmarker auch in diesem Fall ein adäquates Mittel ist. Verglichen mit ^3H -Thymidin erfordert CFSE keine gesonderte, radioaktive Entsorgung des Labormaterials bzw. kein speziell für radioaktives Material eingerichtetes Isotopenlabor [88]. Durch kovalente Bindung des CFSE an intrazelluläre Proteine [19,20], beeinflusst es die genetische Stabilität der proliferierenden Zellen verglichen mit BrdU (Bromdesoxyuridin) nicht. Diese Eigenschaft ermöglicht es, antigenspezifisch proliferierte T-Zellen genetisch stabil aus der Gesamtpopulation zu isolieren und in Restimulationsansätzen weiter zu untersuchen.

8.3. Die gemessenen T-Zell-Antworten sind antigenspezifisch

Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die T-Zellproliferation nach Tuberkulinstimulation –gemessen als CFSE-Ausdünnung– nur dann induzierbar ist, wenn die Meerschweinchen zuvor sensibilisiert wurden. Die T-Zell-Antworten, die mittels T ϕ -Proliferations-Assay quantifiziert wurden, sind antigenspezifisch. Erkennbar ist das an der Betrachtung der Zusammenhänge von Sensibilisierung und später abgerufenen Immunantwort. Mykobakterien vom Tuberkulose-Komplex erzeugen eine gewisse Kreuzreaktivität (*M.tuberculosis* und *M.bovis* mit WHO hum und WHO bov), wohingegen *Mycobacterium avium*-sensibilisierte Tiere nicht auf *M.tuberculosis* und *M.bovis* abgeleitete Antigene und umgekehrt antworten. In dieser Arbeit wurde sich der Kreuzreaktivität zu Etablierungszwecken des Assays bedient, um z.B. die Reproduzierbarkeit des T ϕ -Proliferations-Assay zu zeigen (Siehe Abschnitt 7.2.5). Es war wichtig mit zwei von der WHO anerkannten Referenztuberkulinen bekannter Wirkstärke zu arbeiten. Der T ϕ -Proliferations-Assay wurde hier für die Wirksamkeitsprüfung von bovinen Tuberkulinen etabliert, kann aber genauso für die Chargenprüfung von humanen und aviären Tuberkulinen genutzt werden. Dann ist entsprechend auf Feuchtmassen von *M.tuberculosis*- und *M.avium*-Stämmen für die Sensibilisierung der Meerschweinchen zurückzugreifen, um innerhalb der Wirtsspezifität der zu testenden Tuberkulinpräparate zu bleiben. Die bei Hasløv et al. berichtete unspezifische Proliferation der Zellen konnte hier nicht beobachtet werden [17]. Es ist beschrieben, dass mikrobielle Produkte wie z.B. LPS (Lipopolysaccharide) oder Lipopeptide als sogenannte PAMPs (engl. *Pathogen-associated molecular patterns*) fungieren und unabhängig von einer adaptiven, antigenspezifischen Immunantwort Zellen des angeborenen Immunsystems über eine Erkennung durch PRRs (engl. *Pattern-Recognition-Receptor*) aktivieren können [54]. Dass es sich bei der hier beobachteten Lymphozytenproliferation tatsächlich um eine Immunreaktion auf mykobakterielle Antigene und nicht um eine von PAMPs ausgelöste Zellaktivierung handelt,

konnte durch den Vergleich von mykobakterien-naiven mit sensibilisierten Meerschweinchen belegt werden. Denn die Tuberkulinreaktion war nur in zuvor sensibilisierten Tieren auslösbar. Eine nicht auf einer adaptiven, durch die Sensibilisierung ausgelöste Antwort beruhende Zellreaktivität hätte auch bei den nicht-sensibilisierten Tieren auftreten müssen.

Im T ϕ -Proliferations-Assay reagierten alle naiven Meerschweinchen erwartungsgemäß nicht auf die Tuberkulinstimulation. Unter den für diese Arbeit verwendeten Tiere verhielten sich nur wenige aller sensibilisierten Meerschweinchen als „Non-Responder“, da ihre PBMCs *ex vivo* auf Tuberkulinstimulation hin nicht proliferierten. Die Ursache für so genannte „Non-responder“ liegt in diesem Falle aber mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht an der geringen Sensitivität des T ϕ -Proliferations-Assays, sondern könnte vermutlich an der genetischen Diversität der Dunkin-Hartley-Meerschweinchen liegen.

8.4. Die Sensibilisierungsstrategie beeinflusst die später induzierte Immunantwort

Die Sensibilisierungsstrategie übt entscheidenden Einfluss auf die Intensität der Immunantwort aus. Während der Etablierungsphase des T ϕ -Proliferations-Assays wurden der attenuierte Lebendimpfstoff BCG und hitze-inaktivierte Feuchtmasse des *M.bovis*-Stamms AN5 hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Intensität der später abgerufenen Immunantwort miteinander verglichen. Es wurde deutlich, dass AN5-sensibilisierte Tiere im TST nach Tuberkulininjektion deutlichere und damit optisch besser ablesbare Hautläsionen entwickelten, im Vergleich zu Tieren, die mit BCG sensibilisiert worden waren. Im T ϕ -Proliferations-Assay zeigten ebenso diejenigen Tiere, die mit AN5 sensibilisiert waren, eine wesentlich intensivere Antwort auf eine *ex vivo* Tuberkulinstimulation. AN5-Feuchtmasse musste allerdings mit Paraffinöl adjuvantiert werden, da die in PBS-resuspendierte AN5-Feuchtmasse nur schwache Immunantworten induzierte (Daten nicht gezeigt). Die intramuskulären Injektionen der Feuchtmasse hatte zur Folge, dass sie bei vereinzelt Meerschweinchen sterile Granulome verursachten, die die Tiere allerdings nicht in Fortbewegung, Fressverhalten bzw. Gewichtszunahme und normalem Allgemeinbefinden negativ beeinflussten. Die Überprüfung der Verwendung von alternativen Adjuvanzen als Vehikel für die mykobakterielle Feuchtmasse des *M.bovis*-Stamms AN5 wäre eine Richtung, in der man die Sensibilisierungsstrategie der Tiere weiterführend verfeinern könnte. Paraffinöl hat aufgrund seiner Depotwirkung eine steigende Wirkung auf die Immunantwort, die später induziert werden soll, da es T-Gedächtniszellen sind, die antigenspezifisch auf die folgende Tuberkulinstimulation reagieren sollten. T-Gedächtniszellen entwickeln sich verzögert in der adaptiven Immunantwort, so dass das erstens ein Grund dafür ist, warum die Tuberkulinisierung in der Haut und der hier etablierte T ϕ -Proliferations-Assay erst an Tag 30 nach Sensibilisierung diese T-Gedächtniszellen abrufen und nicht früher und zweitens können durch die Depotwirkung im-

mer wieder naive T-Zellen mit den mykobakteriellen Antigenen geprägt werden, um sich zunächst zu T-Effektorzellen zu entwickeln, von denen sich ein geringer Anteil zu entsprechend in diesem Testsystem benötigten T-Gedächtniszellen entwickeln könnte [89–91].

Das subkutan injizierte BCG, bei dem es sich um einen Lebendimpfstoff handelt, benötigt kein Adjuvans, da es als Lebendimpfstoff eine grundsätzlich für die hier geschilderten Zwecke ausreichende Immunantwort induziert. Allerdings ist die Frage zu stellen, ob das permanente Neuprägen naiver T-Zellen mit adjuvantierter AN5-Feuchtmasse im Körper des Meerschweinchens konsistenter stattfindet als bei der Einbringung von BCG in den Meerschweinkörper. BCG bildete teilweise auch in der Injektionsstelle der Tiere eine kleine, lokal palpierbare Verkapselung. Immunologisch ist der gravierende Unterschied in der Intensität der T-Zell-Antworten zwischen inaktivierter Feuchtmasse und dem attenuierten Lebendimpfstoff BCG für die Sensibilisierung dahingehend zu erklären, dass BCG so weit attenuiert ist, dass dasjenige Antigenspektrum, das im Tuberkulin enthalten ist, dem Immunsystem des Meerschweinchens in der Sensibilisierungsphase nicht angeboten wird. Die in dieser Arbeit getesteten Tuberkuline basieren auf einer virulenten *Mycobacterium bovis*-Stamm AN5-Kultur. Das bedeutet, in den Tuberkulinen sind Antigene enthalten, die der BCG-Stamm nicht mehr exprimiert, präsentiert oder sezerniert. Bekannt ist z.B. das Fehlen von hoch immunogenen Proteinantigenen wie ESAT-6 oder CFP10 [75,92]. Wenn dem BCG-Stamm diese Antigene fehlen, entwickeln BCG-geimpfte Meerschweinchen keine antigenspezifischen T-Zellen dagegen. Wenn im Tuberkulin später ESAT6 und CFP10 stark vertreten sind, wird die Reaktion in BCG immunisierten Tieren entsprechend schwächer ausfallen. Eine weitere Rolle könnte der Herstellungsprozess sowohl von hitze-inaktivierter Feuchtmasse vom *M.bovis*-Stamm AN5 und Tuberkulinen spielen. Besonders bezogen auf die Proteinantigene sind Denaturierungserscheinungen durch den starken Hitzeeinfluss um die 100 °C an der Veränderung der Proteinantigene in Tuberkulinen und auch in der Feuchtmasse vom *M.bovis*-Stamm AN5, mit denen die Tiere sensibilisiert wurden, beteiligt und von Relevanz. Beispielsweise könnte ein denaturiertes ESAT6-Protein in der mykobakteriellen Feuchtmasse vorkommen, das Tier wird damit sensibilisiert und ein ebengleich denaturiertes ESAT6-Protein vom selben Mykobakterienstamm kommt später im Tuberkulinpräparat vor, so gibt es mutmaßlich antigenspezifische T-Zellen im Immunsystem des sensibilisierten Individuums, so dass eine äußerst spezifische T-Zell-Antwort mit dem Tuberkulinpräparat induziert werden kann. Bezüglich der Abrufung unterschiedlicher antigenspezifischer T-Zell-Populationen im TST und im T ϕ -Proliferations-Assay wurde ein Experiment gemacht, bei dem die Tiere statt mit einem Tuberkulinpräparat mit dem lipidhaltigen Antigenpräparat der mykobakteriellen Zellwand von BCG – dem so genannten Total-Lipid - behandelt wurden (Siehe Abschnitt 7.2.7). Die nomi-

nell gleichen Konzentrationen vom Total-Lipid, die an die *ex vivo* Antwort der PBMCs auf den WHO-Standard angepasst waren, induzierten in angepassten Konzentrationen im TST eine wesentlich niedrigere Antwort auf deren intradermale Injektion in sensibilisierten Meerschweinchen. Das ist ein Indiz dafür, dass der Hauttest in einer Antigenpräparation wie dem Tuberkulin vor allem die Proteinantigene detektiert und darauf reagiert, wogegen der T ϕ -Proliferations-Assay die Lipidstrukturen im Tuberkulin erkennt. Um diese These zu untermauern, müsste ein Experiment folgen, in dem das Total-Lipid zuvor mit Lipasen behandelt wird, um einen Verlust der *ex vivo*-Antwort zu generieren bei gleichzeitiger Reproduzierbarkeit der in 7.2.7 gezeigten Hautreaktion. Ein zweites Experiment sähe die Benutzung von aufgereinigten Proteinantigenen in beiden Testsystemen mit dem erwarteten umgekehrten Resultat vor, so dass die Reaktivität auf Proteinantigene im T ϕ -Proliferations-Assay zum WHO-Standard deutlich abfällt und im TST deckungsgleich stark zum WHO-Tuberkulin ansteigt (Siehe auch Abschnitt 8.9).

8.5. Mit der richtigen Sensibilisierung sind die Tiere repetitiv für Blutentnahmen nutzbar

Die wiederholte Blutentnahme diente der Klärung, ob Tiere mehrere Male in einem Abstand von 30 Tagen für die Blutentnahme verwendet werden können, um Tierzahlen zu verringern. Unter Benutzung von AN5-Feuchtmasse zur Sensibilisierung ist das in Erwägung zu ziehen, da die mit Tuberkulin induzierbare Immunantwort im T ϕ -Proliferations-Assay über mehrere Wochen, trotz wiederholter Blutentnahme, konsistent bleibt. Die Immunantwort von BCG-sensibilisierten Tieren dagegen fällt an Tag 60 stark ab und erholt sich an Tag 90 nur leicht. Ein Abfallen der Intensität der Immunantwort an Tag 60 in BCG-sensibilisierten Tieren hat Einfluss auf die Dosisabhängigkeit der Wirksamkeitsmessung des Testtuberkulins. Daraufhin werden erhobene Ergebnisse eines Experiments ungenau und unzuverlässig, was zu Versuchswiederholungen führt. Versuchswiederholungen wiederum stehen genau entgegen der Intention, Versuchstiere einzusparen. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Zellausbeute bei der Blutentnahme bei mit AN5-sensibilisierten Tieren höher ausfällt als bei BCG sensibilisierten Tieren. Auf diese Weise lassen sich möglicherweise weitere Tiere einsparen, weil bei einer entsprechenden Zellausbeute zwei oder mehr Testchargen parallel getestet werden können. Einen breiteren Konzentrationsbereich abzudecken ist vor allem dann sinnvoll, wenn Präparate mit unbekannter Wirksamkeit z.B. direkt nach der Herstellung getestet werden sollen, da im Bereich von 30 IE/mL hinab bis 0,01 IE/mL sowohl das Sättigungsmaximum als auch das Sättigungsminimum erreicht wird. Die Tatsache, dass die Reaktivität der T-Zellen bei AN5-sensibilisierten Tieren konsistenter bleibt, könnte primär an der Adjuvantierung liegen, wodurch erstens die Immunantwort grundsätzlich gesteigert und eine Depotwirkung erreicht werden kann und zweitens die Neuprägung von naiven T-Zellen bei AN5-sensibilisierten Tieren schneller ablaufen könnte. Insgesamt ist zu konstatieren, dass AN5-sensibilisierte Meerschweinchen am Ende robuster auf die Tuberkuline reagierten, die Zellausbeute für den *ex vivo* Versuch höher war und von den Tieren mehrere Male Blut entnommen werden konnte. Aus diesem Grund wurde sich bei der Etablierung der Testmethode auf diese Sensibilisierungsart konzentriert.

8.6. Der T ϕ -Proliferations-Assay misst präzise Dosisabhängigkeiten trotz genetischer Varianz der Meerschweinchen

Bei der Bestimmung der Wirksamkeit beziehungsweise Unbedenklichkeit einer Substanz muss eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennbar sein. Der wohl größte Vorteil der dosisabhängigen Kurve der Immunantwort der Zellen auf Tuberkulinstimulation mit verschiedenen Konzentrationen *ex vivo* ist, dass die Präzision des Tests dahingehend höher ist verglichen zum TST, dass *ex vivo* acht Konzentrationen in Duplikaten und im TST *in vivo* nur drei verschiedene Konzentrationen eines Testtuberkulins in Duplikaten gemessen werden können. Allein die Menge an erhobenen Messwerten steigert die Präzision des Testsystems. Titrationsversuche zeigten, dass Tuberkuline in einem Bereich von 30 IE/mL-0,01 IE/mL im T ϕ -Proliferations-Assay dosisabhängige Proliferation in PBMCs von sensibilisierten Meerschweinchen induzieren können. Bei höheren Konzentrationen wirkt Tuberkulin zytotoxisch und bei niedrigeren ist keine T-Zellantwort mehr messbar. Die Tiere variieren in der Intensität der Immunantwort, aber alle reagieren dosisabhängig. Non-Responder gibt es, allerdings sehr selten, so dass ein Screening auf Responder und Non-Responder vorab nicht zwangsläufig erforderlich ist. Die Variation bezüglich der Antwortintensität innerhalb einer Gruppe basiert unter anderem darauf, dass es sich bei Dunkin-Hartley-Meerschweinchen um einen Auszucht-Stamm handelt. Das bedeutet, ist die genetische Varianz innerhalb der Meerschweinengruppe hoch, ist auch die entsprechende Immunantwort variabel. Hinzukommend wird ein Großteil der Proteinantigene im Tuberkulin über MHC-Moleküle präsentiert, was die Varianz der Immunantworten der Tiere untereinander zusätzlich begünstigt, denn das MHC-Molekül ist genetisch polymorph, da es von bis zu 20 verschiedenen Allelen codiert werden kann [54]. Rückfragen an *Charles River Laboratories* konnten keine spezifischen Auskünfte über das MHC-Repertoire der Dunkin-Hartley-Meerschweinchen geben. Weitere Variablen, die diese Varianz der Immunantworten der Tiere einer Gruppe beeinflussen könnten, sind z.B. die Enthomogenisierung der Sensibilisierungssuspension, was zu unterschiedlicher Sensibilisierungsstärke der Individuen führen könnte. Weiterhin könnte das effektiv applizierte Injektionsvolumen der Tuberkuline in die Haut bei der Tuberkulinisierung Ergebnisse beeinflussen, da nicht immer zu verhindern ist, dass Tröpfchen der Injektion wieder aus der Injektionsstelle hervortreten. Auch die Gruppenhaltung der Tiere, die dominante und submissive Tiere hervorbringt, kann einen gewissen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

8.7. Der T ϕ -Proliferations-Assay ist präziser, sensitiver und objektiver als der TST

Der T ϕ -Proliferations-Assay ist nicht nur sensitiver als der TST, weil er bereits in niedrigeren Dosen Immunantworten detektiert (500 IE/mL im TST vs. 30 IE/mL im T ϕ -Proliferations-Assay als höchste Konzentrationen), er ist auch dahingehend sensitiver, dass unterschiedliche Präparate wesentlich engskaliert differenzierbar sind. Das bedeutet, dass im Hauttest ein Messbereich von 20 mm valide ist, der die Größe der zulässigen Hautläsionen determiniert; im T ϕ -Proliferations-Assay allerdings eine Messskala von 100 % nutzbar ist. Das macht den T ϕ -Proliferations-Assay sensitiver und präziser als den TST. Außerdem stellt eine durchflusszytometrische Datenerhebung einen wesentlich objektiveren Endpunkt eines Testsystems als das Ablesen einer Hautläsion durch zwei verschiedene Experimentatoren dar. Dieses objektive Readout trägt zudem positiv dazu bei, Versuchswiederholungen zu verringern.

Bei einer positiven Proliferation auf den Tuberkulinstimulus erkennt man in den Rohdaten keine zyklischen Mitosephasen, wie man es von PHA kennt, weil die verschiedenen Antigene im Tuberkulin zunächst phagozytiert, prozessiert, präsentiert und von den entsprechenden antigen-spezifischen T-Zellen erkannt werden müssen, bevor diese antigen-spezifischen T-Zellen mit Proliferation darauf reagieren. Da dies für jedes Antigen und jede antigen-spezifische T-Zelle in unterschiedlicher Geschwindigkeit geschieht, wird der hier vorgestellte T ϕ -Proliferations-Assay am Tag 5 nach Inkulturnahme der Zellen gemessen, damit allen in den PBMCs enthaltenden antigen-spezifischen T-Zellen die Möglichkeit hatten, mit Proliferation auf die Stimulation zu reagieren. Bei der Reaktion auf Tuberkulin handelt es sich um eine polyklonale T-Zell-Antwort. PHA dagegen stimuliert unspezifisch alle in der Probe enthaltenden Zellen und nicht nur antigen-spezifische Lymphozyten, so dass die Zellen synchron auf das Mitogen reagieren können. Da PBMCs aufgereinigte Blutzellen sind, handelt es sich hier nicht um eine Zellpopulation gleicher Art, sondern um mehrere Zellpopulationen, deren Zellzyklus eventuell unterschiedlich lang ist. So konnte in diesem Labor die Beobachtung gemacht werden, dass man bei der Positivkontrolle PHA die typischen, einzelnen Mitosezyklen erkennen kann, nicht aber in den Tuberkulinansätzen. Diese Überlegungen passen zu der Tatsache, dass die Gruppenvarianz beim Proliferations-Assay insgesamt niedriger war als beim TST (75 % im TST; 56 % im T ϕ -Proliferations-Assay).

8.8. Der T ϕ -Proliferations-Assay ist in der Durchführung flexibel und effizient

Der T ϕ -Proliferations-Assay ist relativ robust. Die Robustheit des Testsystems stellen entscheidende Kriterien für die Praktikabilität und Effizienz im Einsatz des Assays für die routinemäßige Chargenprüfung von Tuberkulinen dar.

Am Tag der Blutentnahme sollte das entnommene Blut zügig verarbeitet werden, allerdings kann es gut bis zu 4 h bei 4° C bis zur Verarbeitung gelagert werden ohne die Datenqualität zu beeinflussen. Sowohl die Zeit bis zur Verarbeitung als auch die Lagerungstemperatur des entnommenen Blutes scheinen Einfluss auf die Assayqualität bei der Messung von T-Zell-Antworten zu haben. Diese Beobachtung machten auch McKenna et al. [93,94].

Die Thrombozyten mittels langsamem Zentrifugationsschritt aus den PBMCs zu entfernen, ist wichtig, da Thrombozyten mit Monozyten in starker Interaktion stehen. Sobald Thrombozyten aktiviert sind, koagulieren sie mit anderen Zellen und bilden Klumpen.

Für die CFSE-Färbung gilt, dass eine Überfärbung der Zellen weniger kritisch ist als eine Unterfärbung. Bei der Durchführung des T ϕ -Proliferations-Assays entspricht die Anzahl an Proben, deren Zellen zu zählen sind und die mit CFSE gefärbt werden müssen, der Gruppengröße. Bei entsprechend hohem Probenaufkommen muss CFSE nicht μ L-genau pipetiert werden, was entsprechendes Einstellen der Pipette für jede Probe erspart.

Für die Datenanalyse gilt, dass der T ϕ -Proliferations-Assay flexibel und problemlos auch an Tag 6 nach Inkulturnahme der Zellen per Durchflusszytometrie analysiert werden kann. In dieser Hinsicht ist der T ϕ -Proliferations-Assay flexibel und robust. Die Verwendung von Rinder-, bzw. fetalem Kälberserum als Mediumzusatz verursachte schon in der Mediumskontrolle unspezifische Proliferation. Dieses Problem konnte durch die Verwendung von autologem Meerschweinchenserum vermieden werden.

8.9. Der Herstellungsprozess beeinflusst das Ergebnis der Wirksamkeit in beiden Testsystemen nur geringfügig

Wie in Abschnitt 7.2.6 gezeigt, ermittelte der T ϕ -Proliferations-Assay bei wiederholter Prüfung der Wirksamkeit des humanen WHO-Referenztuberkulins ähnliche Schätzwerte wie der TST. Allerdings lagen die Schätzwerte für die Wirkstärke der Chargen im T ϕ -Proliferations-Assay systematisch höher als im Hauttest. Dabei fiel auf, dass die Diskrepanz zwischen den beiden Testergebnissen herstellerabhängig war (Siehe Abbildung 23). Daraus lässt sich schließen, dass – obwohl beide Testergebnisse sehr eng miteinander korrelieren – im Proliferationsassay präferentiell ein etwas anderes Antigenspektrum von Relevanz ist als im Hauttest (Siehe auch Abschnitt 7.2.7 und 8.4). In diesem Zusammenhang ist festzuhalten, dass sich die Herstellungsgänge von Hersteller zu Hersteller unterscheiden: Während Hersteller I das Kulturmateriale einer Diafiltration unterzieht, führen Hersteller II und III eine Trichloressigsäure-Fällung durch. Da die Diskrepanz zwischen Proliferations- und Hauttest bei Hersteller I und II im Vergleich zu Hersteller III relativ ähnlich ist, ist es unwahrscheinlich, dass die Unterschiede im Herstellungsgang die Diskrepanzen erklären. Hingegen gibt es Hinweise darauf, dass Hersteller I und II einen eng verwandten Produktionsstamm verwenden. Von daher kann man davon ausgehen, dass der Unterschied in der Antigenzusammensetzung nicht so sehr im Herstellungsgang, sondern eher im Produktionsstamm begründet liegt. Da dieser Parameter aufgrund der standardisierten Herstellungsweise, insbesondere der Verwendung eines „Seed-lot Systems“, gleich bleibt, lässt sich die Diskrepanz durch einen Hersteller-spezifischen Korrekturfaktor ausgleichen. Wie in Abbildung 26 gezeigt, macht ein derartiger Ansatz Sinn, denn zumindest die bislang erhobenen Wirkstärkenshätzer lassen sich auf diese Weise nahezu in Deckung bringen.

Um die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des TST und des T ϕ -Proliferations-Assays weiter zu untersuchen, wurden beide Methoden mit einem Chloroform-Methanol-Extrakt einer BCG-Kultur in AN5-sensibilisierten Tieren durchgeführt (Siehe auch Abschnitt 7.2.7 und 8.4). Es ist beschrieben, dass Lipidbestandteile der mykobakteriellen Zellwand als Antigene in der Immunantwort gegen Mykobakterien eine profunde Stellung einnehmen [23,76,79,85,95]. Dabei wird zwischen MHC-restringierten Lipopeptiden unterschieden, deren Proteincharakter die Antigenität des Moleküls determiniert und CD1-restringierten Glycolipiden. Da es sich beim Tuberkulin um ein Antigengemisch aus Protein- und Lipidantigenen handelt, galt es zu klären, ob die Einbringung dieses Gemisches in die Haut, was ja eine Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ induziert, besonders proteinspezifische T-Zellpopulationen abrufte und konträr dazu, ob die *ex vivo*-Reaktion der PBMCs besonders auf Lipidstrukturen innerhalb des Tuberkulins reagierte.

Dabei fiel auf, dass lipidhaltige Antigenpräparationen bei nominell gleichem Konzentrationseinsatz im T ϕ -Proliferations-Assay eine fast identisch intensive Immunantwort auslöste, wie das bovine WHO-Tuberkulin, wohingegen diese lipidhaltige Antigenpräparation bei gleichem Konzentrationseinsatz im TST verglichen zum bovinen WHO-Tuberkulin eine wesentlich schwächere Antwort auslöst. Dieser Tatsache könnte immunologisch zu Grunde liegen, dass die Antigenpräsentation in der Haut über Langerhans Zellen oder epidermale DCs erfolgt, im *ex vivo* Assay über nicht-ausdifferenzierte Monozyten und B-Zellen. Wenn also hypothetisch der TST sensitiver für Proteinantigene zu sein scheint, wohingegen der T ϕ -Proliferations-Assay sensitiver für Lipidantigene sein könnte, sei das experimentell zu untermauern, indem man delipidiertes Tuberkulin in beiden Methoden untersucht. Dabei müsste die Reaktivität im Hauttest auf das Niveau vom Total-Lipid sinken. In einem durch das BMBF geförderten Folgeprojekt soll diese Frage weiter untersucht werden.

8.10. Rekombinant exprimierte Meerschweinchenzytokine sind funktionell

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass das Meerschweinchen ein geeignetes Model für die Untersuchung von Immunantworten auf Mykobakterien darstellt [25,30]. Außerdem gibt es Arbeitsgruppen, die die Entwicklung geeigneter rekombinanter Agenzien für die Charakterisierung von Meerschweinchenzellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmoleküle publiziert haben [96]. Bezugnehmend auf Arbeiten, die Knochenmarks- und Milzzellen, PBMCs und Thymozyten des Meerschweinchens [25] als Quelle für CD1-exprimierende Zellen nutzten, wurde in dieser Arbeit dargelegt, wie aus Monozyten abgeleitete antigen-präsentierende Zellen mittels rekombinanter gpGM-CSF- und gpIL4-Stimulation *in vitro* differenziert wurden. Die CD1-Expression konnte bei Monozyten signifikant gesteigert werden, was durch durchflusszytometrische Analysen mittels Antikörperfärbung selektiv auf das CD1-Protein auf der Zelloberfläche quantifiziert wurde (Siehe Abbildung 30). Aufgrund der weiteren Ausdifferenzierung eignen sich Monozyten als Quelle für APCs besser als Knochenmarkszellen, da die Differenzierung innerhalb 24 h erfolgt, solange auch autologe PBMCs kultiviert werden können und das Meerschweinchen in diesem Fall nur als Blutspender fungiert und folglich nicht getötet werden muss. Die Experimente, die mit Knochenmarkszellen (Daten nicht gezeigt) durchgeführt wurden, dienten in dieser Arbeit lediglich der Funktionsüberprüfung von rekombinant exprimierten gpGM-CSF und gpIL4, allerdings auch der Etablierung eines Lipid-Stimulations-Assays, zu dessen Resultat zusammenfassend gesagt werden kann, dass Monozyten des peripheren Blutes für weitere Versuchszwecke die optimale Quelle für APCs darstellten - mit dem einzigen Nachteil, dass die Zellausbeute verglichen z.B. zum Knochenmark geringer ist.

8.11. Basierend auf dem T_C-Proliferations-Assay konnte ein weiteres Tool für die Untersuchung von T-Zell-Antworten auf mykobakterielle Lipidantigene etabliert werden

Ziel der Etablierung des Lipid-Stimulations-Assays war es, ein Tool zur Verfügung zu stellen, mit dessen Hilfe CD1-restringierte T-Zell-Antworten auf mykobakterielle Glycolipidantigene studiert werden können. Es ist bekannt, dass nicht nur mykobakterielle Proteinantigene das Immunsystem eines infizierten Individuums stimulieren, sondern auch mykobakterielle Glycolipidantigene wie ManLAM und GMM [78,79,81,97]. Ungeklärt ist dabei allerdings die Rolle der CD1-restringierten, ManLAM- und GMM-spezifischen T-Zell-Populationen in der Gesamtimmunantwort auf eine Mykobakterieninfektion und welchen Beitrag sie auch eventuell zu der Granulombildung bei der Primärinfektion leisten könnten.

Aus deskriptiven Daten von latent infizierten menschlichen Personen, deren Immunsystem also in der Lage ist, die mykobakterielle Infektion in Schach zu halten, ist bekannt, dass ManLAM und GMM von *M.tuberculosis* eine ähnlich intensive Immunantwort erzeugen, wie das hoch immunogene mykobakterielle Proteinantigen ESAT-6. Das mykobakterielle Glycolipid PIM₂ dagegen stimuliert das Immunsystem latent infizierter Blutspender dagegen kaum und bei Personen mit einer akuten Tuberkulose, sind diese T-Zell-Populationen nicht mehr abrufbar (Bastian et al., unveröffentlichte Beobachtung). Bekannt ist weiterhin, dass die CD1 restringierten T Zellen im Menschen das antibakterielle Peptid Granulysin (das es beim Meerschweinchen nicht gibt) und zytolytisches Perforin, genau wie CD8-positive, cytotoxische T-Zellen sezernieren und so Apoptose in den Zielzellen induzieren können.

Erkenntnisse über die Rolle der lipidspezifischen T-Zellen könnten wichtig für die Optimierung von Tuberkulinpräparaten zu Diagnosezwecken von Tuberkulose sein. Von Interesse ist das aber vor auch für die Impfstoffentwicklung zur Prävention der Tuberkulose. Denn basierend auf den bekannten Daten und den deskriptiven Daten von *Bastian et al.* wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine ManLAM- und/oder GMM-spezifische, CD1-restringierte T-Zell-Population vielleicht dazu beitragen kann, das infizierte Individuum in der latenten Phase der Tuberkuloseinfektion zu halten und dass der Verlust dieser T-Zell-Population mit dem Übergang in die akute Phase der Tuberkulose einhergeht.

Zur Überprüfung dieser Hypothese war es Ziel in dieser Arbeit, ein Modell zu etablieren, mit dessen Hilfe immunologische Fragestellungen an die Rolle der T-Zell-Populationen im Zusammenhang mit CD1-restringierten, mykobakteriellen Lipidantigenen untersucht werden können. Hier wurde der Grundstein dafür gelegt, in einem Folgeprojekt die Rolle von T-Zellen im Zusammenhang mit ManLAM und GMM untersuchen zu können, in dem ManLAM- und GMM-spezifische T-Zell-Antwort überhaupt erst quantifizierbar gemacht wurden.

Die ausgewählten Lipidantigene und ihre Derivate stellen Antigene im Zusammenhang mit Tuberkulose dar und sind nicht kovalent gebundene, häufig vorkommende Bestandteile der mykobakteriellen Zellwand. Als peripher gelegene Bestandteile der mykobakteriellen Zellwand sind es auch diejenigen Antigene, mit denen das Immunsystem bei einer Infektion mit Mykobakterien zuerst in Kontakt treten kann. Somit eignen sie sich als ausgewählte Antigene besonders gut für die Entwicklung eines *ex vivo* Lipid-Stimulations-Assays im Meerschweinchenmodell.

Ein Tiermodell ist deswegen notwendig, da eine zuverlässige Datenerhebung von latent infizierten Personen oft nur deskriptiv möglich ist, da sich diese Patienten beispielsweise bereits in Antibiotikabehandlung befinden oder Co-Infektionen mit HIV aufweisen, was die reine Immunantwort auf Mykobakterien beeinflusst.

Das Meerschweinchen ist als Tiermodell der Tuberkulose gut geeignet [30], da die Infektion und der Krankheitsverlauf in diesem Tier vergleichbar zum Verlauf im Menschen ist. Dies gilt insbesondere für Untersuchungen zu CD1-restringierten Immunantworten, da Meerschweinchen – im Gegensatz zur Maus – natürlicherweise CD1 exprimieren [23,25,98]. Im Menschen exprimieren corticale Thymozyten, Langerhans-Zellen, dendritische Zellen, B-Zellen (CD1c), Darmepithelzellen, Zellen der glatten Muskulatur und Blutgefäße (CD1d) die Gruppe 1 CD1 Moleküle. Im Meerschweinchen konnten CD1-Moleküle hauptsächlich auf von Knochenmarkszellen abgeleiteten Dendritischen Zellen detektiert werden, aber auch auf der Zelloberfläche von Thymozyten und innerhalb der PBMCs und Milzzellen auf B-Zellsubpopulationen [25].

Die Frage, ob mykobakteriell sensibilisierte Meerschweinchen genau wie der sensibilisierte Mensch auf die genannten Lipidantigene messbare T-Zellantworten generiert, konnte bejahend mit der Entwicklung des Lipid-Stimulations-Assays beantwortet werden. Es konnte grundsätzlich gezeigt werden, dass T-Zellen *ex vivo* auf mykobakterielle Lipidantigene, die von *ex vivo* differenzierten antigenpräsentierenden Zellen präsentiert wurden, aktiviert werden und mit einer messbaren Proliferation reagierten.

Der erste Schritt dazu war die rekombinante Expression von Meerschweinchenzytokinen, mit Hilfe derer definierte Mengen an CD1-exprimierende Zellen *in vitro* generiert werden konnten (Siehe Abschnitt 6.6 und 7.3). Im zweiten Schritt wurde basierend auf dem für diese Arbeit etablierte T ϕ -Proliferations-Assay ein so genannter Lipid-Stimulations-Assay etabliert, der um eine definierte Menge CD1-positiver antigenpräsentierender Zellen erweitert ist, um mykobakterielle Glycolipidantigene für antigenspezifische T-Zellen zugänglich zu machen.

Es wurde gezeigt, dass definierte CD1-restringierte Antigene eine messbare T-Zellantwort in sensibilisierten Meerschweinchen *ex vivo* induzieren können, dass diese T-Zellantwort antigenspezifisch ist (Siehe Abbildung 31) und nur in Gegenwart CD1-exprimierender antigen-präsentierender Zellen induzierbar ist (Siehe Abbildung 32). Während mit den aufgereinigten Lipiden ohne CD1-exprimierende APCs keinerlei Reaktivität zu verzeichnen ist, enthält das Total-Lipid Lipopeptide, die über MHC-II Moleküle an T Zellen präsentiert werden können [86]. Dies erklärt die verminderte, aber noch deutlich messbare Reaktivität auf das Gesamtlipid in Abwesenheit CD1-exprimierender APCs. Die Restriktion der lipid-reaktiven T Zellen ließe sich klassischerweise beweisen, in dem man das CD1-Molekül auf den von Monozyten abgeleiteten APCs mittels Antikörper blockiert. Durch die lange Kultivierungsdauer von fünf Tagen kann allerdings nicht gewährleistet werden, dass der CD1-spezifische Antikörper für die gesamte Kultivierungsdauer am CD1-Molekül gebunden bleibt, so dass eine alternative Möglichkeit wäre, die CD1-Restriktion dieser Antigene dahingehend zu beweisen, in dem man eine Zelllinie rekombinant mit dem CD1-Molekül transduziert. Ein Nachteil dieses Experimentaufbaus ist allerdings, dass die Antigenprozessierung in Phagosom bzw. Phagolysosom nicht gewährleistet werden kann, um den *in vivo*-Vorgang eindeutig *in vitro* zu simulieren. Insofern muss eine geeignete Zelllinie ausgewählt werden, die mit dem CD1-Molekül transduziert werden würde, um die Antigenprozessierung weiterhin zu gewährleisten.

Der hier etablierte Lipid-Stimulations-Assay kann zukünftig dafür verwendet werden, CD1-restringierte T-Zellen zu untersuchen. Diese CD1-restringierten T-Zell-Populationen können mittels Zellsortierung aus der Gesamtpopulation isoliert werden und typisiert werden. In Restimulationsassays kann die Spezifität dieser Zellpopulationen genauer definiert werden oder deren Zytokinprofile ermittelt werden. Das Wissen darüber kann eine Basis für die Entwicklung experimenteller Impfstoffe darstellen, mit Hilfe derer jene T-Zell-Populationen im Individuum angereichert werden könnten. Mit dem Meerschweinchen als Tiermodell könnten Infektionsversuche und die anschließende Durchführung des Lipid-Stimulations-Assay Erkenntnisse über die Protektivität jener T-Zell-Populationen gewonnen werden.

8.12. Fazit

Abschließend ist zusammenzufassen, dass in dieser Dissertation eine Prüfmethode etabliert wurde, die hervorragende Voraussetzungen hat, den für die Meerschweinchen belastenden Teil - dem Tuberkulin-Hauttest - während der gesetzlich geforderten Chargenprüfung von Tuberkulinen vollständig zu ersetzen, so dass das Meerschweinchen lediglich als Blutspender fungieren muss. Dabei gilt es zu klären, in wie weit die Anwendung des hier ermittelten, Hersteller spezifischen Korrekturfaktors in der regulären Chargenprüfung statthaft ist. Es ist kein wirkliches Replacement im Sinne des 3R-Konzepts von Russel und Burch, bei dem diese eigentlich den gesamten Verzicht auf die Nutzung des Tieres fordern. Eine Sensibilisierung der Tiere, die auf eine letale Infektion verzichtet, erspart dem Tier zusätzliches Leid, erspart dem durchführenden Labor das Einrichten und die Verfügbarkeit einer S3-Einheit im Tierstallbereich und schützt das Laborpersonal vor einem infektiösen Gefahrenpotential. Die Nutzung von Blut sensibilisierter Meerschweinchen stellt nicht nur einen Fortschritt hinsichtlich des Tierschutzes von Labortieren dar, sondern kann zukünftig auch ein wirtschaftlicher Erfolg sein, denn das Einsparen von Tieren durch repetitive Blutentnahmen oder das Testen von mehreren Chargen gleichzeitig spart deutliche Kosten hinsichtlich der Tierhaltung, Labormaterialien und Personal ein. Der im T ϕ -Proliferations-Assay objektivere Endpunkt durch die Datenerhebung mittels Durchflusszytometrie erhöht die Reproduzierbarkeit und Robustheit des Tests, so dass Versuchswiederholungen entfallen, was zusätzlich Tiere schützt und Kosten einspart.

Zusätzlich zum Erfolg für die gesetzlich geforderte Chargenprüfung wurde in dieser Arbeit auch der Grundstein für die Nutzung des Meerschweinchenmodells für immunologische Fragestellungen hinsichtlich mykobakterieller Immunantworten gelegt. Das Meerschweinchen ist jetzt zugänglich, um CD1-restringierte T-Zellen zu quantifizieren, zu isolieren und weiter auf ihre Eigenschaften hin zu untersuchen. Für die Impfstoffentwicklung im Kampf gegen Tuberkulose wäre es wünschenswert, Antworten darauf zu finden, ob jene T-Zell-Population protektive Eigenschaften für das Individuum hat und wenn ja, ob es eine Möglichkeit gibt, diese T-Zell-Population im Immunsystem anzureichern. Die Nutzung der in dieser Dissertation dargestellten Techniken stellt die Öffnung eines Forschungsfeldes dar, das hoffentlich viele noch offene Fragen bezüglich der Immunantwort auf Mykobakterien beantworten können wird.

9. Anlagen

TB

Tuberkulin - Prüfung: WHO bovis Charge:

Tier 1-5; 11; 12 AN5
Tier 6-10; 13; 14 BCG

Sensibilisierung der Tiere am: Tuberkulinprüfung am: Ablesung (in mm) nach: a+b= 24Std., c= 48Std.

ANS	Feuchtmasse	Prob.	rechts						links					
			A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
MS-Nr.:1	Külg 1 Kopf ANS	Verd.	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
		a												
		b												
		c												
MS-Nr.:2	Külg 1 Rücken ANS	Verd.	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5
		a												
		b												
		c												
MS-Nr.:3	Külg 1 Po ANS	Verd.	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4
		a												
		b												
		c												
MS-Nr.:4	Külg 1 Links ANS	Verd.	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3
		a												
		b												
		c												
MS-Nr.:5	Külg 1 Rechte ANS	Verd.	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2
		a												
		b												
		c												
MS-Nr.:11	Külg 1 Kopf ANS	Verd.	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1
		a												
		b												
		c												
MS-Nr.:12	Külg 1 Rücken ANS	Verd.	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
		a												
		b												
		c												
MS-Nr.:6	Külg 2 Kopf BCG	Verd.	1	2	3	7	8	9	1	2	3	7	8	9
		a												
		b												
		c												
MS-Nr.:7	Külg 2 Rücken BCG	Verd.	9	1	2	3	7	8	9	1	2	3	7	8
		a												
		b												
		c												
MS-Nr.:8	Külg 2 Po BCG	Verd.	8	9	1	2	3	7	8	9	1	2	3	7
		a												
		b												
		c												
MS-Nr.:9	Külg 1 Links BCG	Verd.	7	8	9	1	2	3	7	8	9	1	2	3
		a												
		b												
		c												
MS-Nr.:10	Külg 2 Rechte BCG	Verd.	3	7	8	9	1	2	3	7	8	9	1	2
		a												
		b												
		c												

Abbildung 33: Rohdatenblattvorlage zur Dokumentation der mittels Lineal ermittelten Durchmesser der Hautläsionen 24 h nach der Tuberkulinisierung

Method	TST
Assay number	
Technician	Christina und Isa
Date of assay	11.10.2013
	Tag 1

24h nach Tuberkulinisierung händisch Meerschweinchen 1



Standard				
Id.	WHO Mycobakt bovis			
Ass. pot.	11700IU/ml			
Doses	(1)	(2)	(3)	(4)
1/23	16	19	18	18
1/69	14	15	15	16
1/207	11	11	14	11

Sample 1				
Id.				
Ass. pot.	30000IU/ml			
Doses	(1)	(2)	(3)	(4)
1/6	21	21	20	20
1/18	18	16	18	16
1/53	15	12	15	12

Model: Parallel lines

Design: Completely randomised

Transformation: $y' = y$

Variance: Observed residuals

Common slope(factor) = 2.96985 (2.48003 to 3.45967)

Correlation | r |: 0.934103

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-ratio	Probability
Preparations	1	28.1667	28.1667	18.436	0.000 (***)
Regression	1	168.884	168.884	110.542	0.000 (***)
Non-parallelism	1	1.11378	1.11378	0.729	0.404
Non-linearity	2	0.169071	0.0845357	0.055	0.946
Standard	1	0.166667	0.166667	0.109	0.745
Sample 1	1	0.00240483	0.00240483	0.002	0.969
Treatments	5	198.333	39.6667	25.964	0.000 (***)
Residual error	18	27.5000	1.52778		
Total	23	225.833	9.81884		

Sample 1			
Id.			
(IU/ml)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	4370.28	6291.37	9623.56
Rel. to Ass.	14.6%	21.0%	32.1%
Rel. to Est.	69.5%	100.0%	153.0%

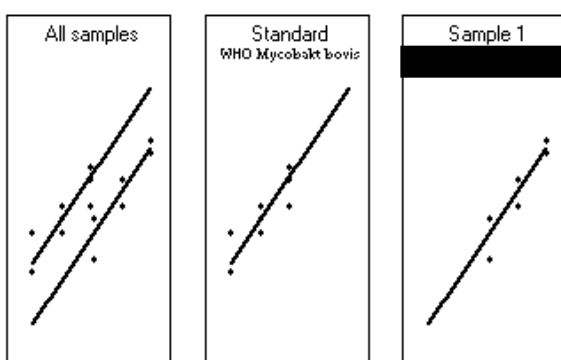


Abbildung 34: Exemplarische Auswertung für die im TST ermittelten Daten eines Meerschweinchenindividuums mittels CombiStats-Software zur Potenzermittlung eines Testtuberkulins gegen ein Referenztuberkulin unter Nutzung des Parallel-Line-Assays. Durch CombiStats-Software ermittelter Wirksamkeitsschätzwert von im TST erhobenen Daten in einem Meerschweinchen mit Angabe des Konfidenzintervalls. An die Messwerte werden parallele Geraden angepasst. Der vertikale Abstand der Geraden zueinander ist ein Maß für die Wirkstärke.

Substance	Tuberculin
Method	Tc Assay
Assay number	TBX09
Technician	Riki & Christina
Date of assay	28.11.2013



Standard		
Id.	WHO bov	
Ass. pot.	11700 IU/mL	
Pre-dil. 1	1 mL/390 mL	
Doses	(1)	(2)
1/1	75.66	75.73
1/3	69.18	67.61
1/9	50.87	58.04
1/27	41.21	47.52
1/81	32.76	27.73
1/243	19.89	23.19
1/729	13.03	8.14
1/2187	9.11	5.34

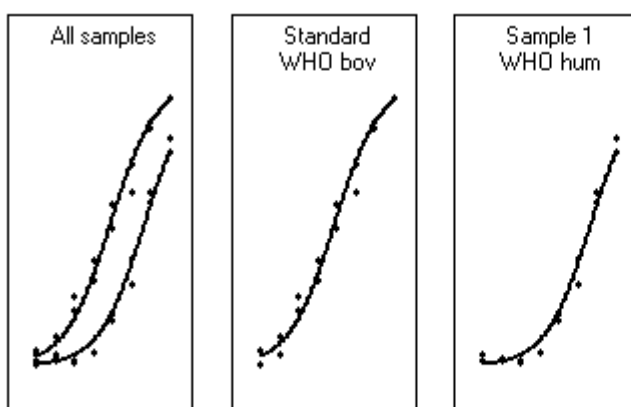
Sample 1		
Ass. pot.	5000 IU/mL	
Pre-dil. 1	1 mL/166.66 mL	
Doses	(1)	(2)
1/1	65.36	61.72
1/3	48.04	50.92
1/9	33.46	26.54
1/27	18.85	16.92
1/81	8.73	8.75
1/243	5.86	6.56
1/729	6.53	6.82
1/2187	7.99	6.64

Model: Sigmoid curves
 Design: Completely randomised
 Transformation: $y' = \logit(y)$
 Variance: Observed residuals

Common slope(factor) = 0.765113 (0.713776 to 0.816449)
 Correlation | r |: 0.972667 (Weighted), 0.992753 (Unweighted)
 Asymptotes: 4.67414 and 79.9699

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	Chi-square	Probability
Preparations	1	33.0825	33.0825	4.34648	0.037 (*)
Regression	1	4574.19	4574.19	600.970	0.000 (***)
Non-parallelism	1	72.2461	72.2461	9.49189	0.002 (**)
Non-linearity	12	68.5478	5.71232	9.00601	0.702
Standard	6	46.1506	7.69176	6.06340	0.416
Sample 1	6	22.3972	3.73287	2.94261	0.816
Treatments	15	4748.06	316.538	623.814	0.000 (***)
Residual error	16	121.781	7.61134		
Total	31	4869.85	157.092		

Sample 1			
Id.			
(IU/mL)	Lower limit	Estimate	Upper limit
Potency	557.941	694.265	861.353
Rel. to Ass.	11.2%	13.9%	17.2%
Rel. to Est.	80.4%	100.0%	124.1%



Executed by:

Calculated by:

Approved by:

Abbildung 35: Exemplarischer Screenshot einer CombiStats-Auswertung von im T-Zell-Proliferations-Assay erhobener Daten unter Nutzung des Sigmoid-Curve-Models. Unter Nutzung von CombiStats-Software ermittelte Wirksamkeitsschätzwert für humanes WHO-Tuberkulin mit Konfidenzintervall.

10. Literaturverzeichnis

- [1] Koch R. Weitere Mitteilungen über ein Heilmittel gegen Tuberkulose, Aus: Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1890, Nr. 46a [Internet]. Gesammelte Werke von Robert Koch, S.661-668: Robert Koch-Institut. Available from: <http://edoc.rki.de/docviews/abstract.php?lang=ger&id=621>.
- [2] Koch R. Weitere Mitteilung über das Tuberkulin, Aus: Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1891, Nr. 43. Gesammelte Werke von Robert Koch, S.673-682: Robert Koch-Institut. Available from: <http://edoc.rki.de/docviews/abstract.php?lang=ger&id=623>.
- [3] Koch R. Über die Ätiologie der Tuberkulose, Aus: Verhandlungen des Kongresses für innere Medizin. Erster Kongreß, Wiesbaden 1882 Verlag von J. F. Bergmann. Gesammelte Werke von Robert Koch (Band 1), S.446-453: Robert Koch-Institut. Available from: <http://edoc.rki.de/docviews/abstract.php?lang=ger&id=611>.
- [4] Alito A, McNair J, Girvin RM, Zumarraga M, Bigi F, Pollock JM, Cataldi A. Identification of Mycobacterium bovis antigens by analysis of bovine T-cell responses after infection with a virulent strain. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.] (11). 2003:1523–31.
- [5] Russell, W. M. S; Burch RL, editors. The principles of humane experimental technique. South Mimms, Potters Bar, Herts, England: Universities Federation for Animal Welfare; 1992. xiv, 238. ISBN: 0900767782.
- [6] Pirquet C v. Tuberkulindiagnose durch cutane Impfung. Berliner Klinische Wochenschrift. Band 44.1907, S.644-645.
- [7] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). European Pharmacopoeia, 8th edition 2013, english, Subscription to Main volume + Supplement 1 + Supplement 2. 1/2008:0536. 8th ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2013. ISBN: 978-3-7692-6099-1.
- [8] Koch R. Die Ätiologie der Tuberkulose Aus: Mitteilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, 1884, Bd. II, Berlin, Aus: Mitteilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte, 1884, Bd. II, Berlin. Gesammelte Werke von Robert Koch, S.467-565: Robert Koch-Institut. Available from: <http://edoc.rki.de/docviews/abstract.php?lang=ger&id=613>.
- [9] Koch R. Fortsetzung der Mitteilungen über ein Heilmittel gegen Tuberkulose, Aus: Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1891, Nr. 3. Gesammelte Werke von Robert Koch, S.669-672: Robert Koch-Institut. Available from: <http://edoc.rki.de/docviews/abstract.php?lang=ger&id=622>.
- [10] Koch R. Übertragbarkeit der Rindertuberkulose auf den Menschen – Vortrag, gehalten auf der Internationalen Tuberkulosekonferenz zu Berlin gelegentlich der Diskussion über das obengenannte Thema Aus: Deutsche Medizinische Wochenschrift. 1902, Nr. 48, Aus: Deutsche Medizinische Wochenschrift. 1902, Nr. 48. - Mit geringer Abänderung der Einleitung auch veröffentlicht in den Verhandlungen der ersten Internationalen Tuberkulosekonferenz 1902. Gesammelte Werke von Robert Koch (Band 1), S.578-590: Robert Koch-Institut. Available from: <http://edoc.rki.de/docviews/abstract.php?lang=ger&id=615>.
- [11] Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, Kantor I de, Meslin FX. Zoonotic tuberculosis due

- to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases* (1). 1998:59–70.
- [12] Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln, AMG. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz; Neugefasst durch Bek. v. 12.12.2005 I 3394; . Available from:
http://www.gesetze-im-internet.de/amg_1976/BJNR024480976.html#BJNR024480976BJNG000203310.
- [13] Verordnung über Sera, Impfstoffe und Antigene nach dem Tiergesundheitsgesetz (Tierimpfstoff- Verordnung), TierImpfStV. Bundesministeriums der Justiz und für Verbraucherschutz; 2006.
- [14] Rennie B, Filion LG, Smart N. Antibody response to a sterile filtered PPD tuberculin in *M. bovis* infected and *M. bovis* sensitized cattle. *BMC Vet Res*. 2010:50.
- [15] Weisser, K., Hechler, U., Halder, M. & Bottrill, K. Animal Welfare Aspects in the Quality Control of Immunobiologicals: A Critical Evaluation of the Animal Tests in Pharmacopoeial Monographs. FRAME for ECVAM and PEI, 1997., FRAME for ECVAM and PEI, 1997.
- [16] Huebner RE, Schein MF, Bass JB. The Tuberculin Skin Test. *Clinical Infectious Diseases* (6). 1993:968–75.
- [17] Hasløv K, Bentzon MW, Møller S. Comparison in sensitized and unsensitized guinea-pigs of tuberculin PPDs RT 23 and PPD-M by skin tests and lymphocyte stimulation tests. Effect of immunization time. *Journal of Biological Standardization* (2). 1986:143–52.
- [18] Hasløv K, Closs O, Møller S, Bentzon MW. Studies on the development of tuberculin sensitivity in immunized guinea pigs with demonstration of a close relationship between results of skin tests and the lymphocyte transformation technique. *International Archives of Allergy and applied Immunology* (2). 1984:114–22.
- [19] Jedema I, van der Werff, Nicole M, Barge, Renée M Y, Willemze R, Falkenburg, J H Frederik. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. *Blood* (7). 2004:2677–82.
- [20] Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of Immunological Methods* (1-2). 2000:147–54.
- [21] Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* (1). 1994:131–7.
- [22] Spohr C, Kaufmann E, Battenfeld S, Duchow K, Cussler K, Balks E, Bastian M. A New Lymphocyte Proliferation Assay for Potency Determination of Bovine Tuberculins. *Altex Journal*, May 2015. doi: 10.14573/altex.1502101
- [23] Hiromatsu K, Dascher CC, LeClair KP, Sugita M, Furlong ST, Brenner MB, Porcelli SA. Induction of CD1-Restricted Immune Responses in Guinea Pigs by Immunization with Mycobacterial Lipid Antigens. *The Journal of Immunology* (1). 2002:330–9.
- [24] Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annual Review of Immunology*. 1999:297–329.
- [25] Hiromatsu K, Dascher CC, Sugita M, Gingrich-Baker C, Behar SM, LeClair KP, Brenner MB, Porcelli SA. Characterization of guinea-pig group 1 CD1 proteins. *Immunology* (2). 2002:159–72.

-
- [26] Boxtel, Christoffel Jos van, Santoso B, Edwards IR. Drug benefits and risks, International textbook of clinical pharmacology. 2nd ed. Amsterdam, Uppsala, Sweden: los Press; Uppsala Monitoring Centre; 2008. 1 online resource (xxiii, 821. ISBN: 978-1-58603-880-9.
- [27] Franco N. Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective. *Animals* (1). 2013:238–73.
- [28] Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. Tier-schutzbericht der Bundesregierung 2011. 2011 Aug 22.
- [29] Yang H, Kruh-Garcia NA, Dobos KM. Purified protein derivatives of tuberculin--past, present, and future. *FEMS immunology and medical microbiology* (3). 2012:273–80.
- [30] Taylor DK; Lee VK; Suckow MA; Stevens KA; Wilson RP, editors. Guinea Pigs as Experimental Models // The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents. Oxford: Academic Press; 2012. 1 online resource (xix, 1268. ISBN: 978-0-12-380920-9.
- [31] Moser I., Köhler H. Tiergesundheitsjahresbericht 2013, Tuberkulose der Rinder – Bovine Tuberculosis.
Available from:
https://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/TG-JB/TGJB_2013.pdf
- [32] Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen, TierSeuchAnzV. Bundesminis-terium der Justiz und für Verbraucherschutz.
Available from: http://www.gesetze-im-internet.de/tierseuchanzv/__1.html.
- [33] Selbitz H; Truyen U; Valentin-Weigand P; Alber G; Rolle M; Mayr A, editors. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 103 Tabellen. 9th ed. Stuttgart: Enke; 2011. XVI, 710 S. ISBN: 9783830410805.
- [34] Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (Tuberkulose-Verordnung) RindTbV, RindTbV. Bundesministeriums der Justiz und für Ver-braucherschutz; 16.06.1972.
- [35] Friedrich-Löffler-Institut. Informationen des FLI: Rindertuberkulose [Internet] [cited 2014 Dec 1].
Available from: <http://www.fli.bund.de/de/startseite/publikationen/informationen-zu-tierseuchen.html>.
- [36] Weltgesundheitsorganisation WHO. Fact sheets on tuberculosis, WHO Global Tuberculosis Report 2014.
Available from: http://www.who.int/tb/publications/factsheet_global.pdf
- [37] Haile M, Källenius G. Recent developments in tuberculosis vaccines. *Current opinion in infectious diseases* (3). 2005:211–5.
- [38] Cartwright JD. BCG vaccination of the newborn. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* (2). 1978:65–7.
- [39] Styblo K, Ferlinz C. BCG-Impfung in der Bundesrepublik Deutschland? [BCG vaccination in West Germany?]. *Pneumologie* (Stuttgart, Germany) (2). 1994:151–5.
- [40] Pereira SM, Dantas, Odimariles Maria Souza, Ximenes R, Barreto ML. Vacina BCG contra tuberculose: efeito protetor e políticas de vacinação [BCG vaccine against tuberculosis: its protective effect and vaccination policies]. *Revista de saúde pública*. 2007:59–66.
- [41] Hashimoto T. BCG vaccines for the prevention of tuberculosis in the world. *Kekkaku: [Tuberculosis]* (11). 1997:629–37.

-
- [42] González Saldaña N, Macías Parra M, Hernández Porras M, Gutiérrez Castrellón P, Gómez Toscano V, Juárez Olguin H. Pulmonary tuberculosis: Symptoms, diagnosis and treatment. 19-year experience in a third level pediatric hospital. *BMC Infectious Diseases*. 2014:401.
- [43] Schaberg T. Richtlinien zur medikamentösen Behandlung der Tuberkulose im Erwachsenen- und Kindesalter. *Pneumologie*. Available from: <http://www.kongressanmeldung.de/SDGP/img/44e20f6e7326a36f.pdf>
- [44] Talukdar D, Sharma R, Sharma AK, Kumar R. Drug Resistance in Tuberculosis: How to Counter The Menace? *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2014.
- [45] Koch A, Wilkinson RJ. The road to drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Biology* (11). 2014:520.
- [46] EDWARDS PQ, EDWARDS LB. Story of the tuberculin test from an epidemiologic viewpoint. *The American Review of Respiratory Disease*. 1960:1–47.
- [47] Statens Serum Institut. Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels), Tuberkulin PPD RT 23 SSI. 5.2 Pharmakokinetische Eigenschaften. Last revised 2011 Nov 24.
- [48] Funk EH, Huntoon FM. Biochemical Studies of Bacterial Derivatives: XI. Skin Reactions in Man with Human Tubercle Bacillus Protein MA-100--preliminary Report. *Journal of Immunology*. 1930:19:237-253.
- [49] Seibert FB, Glen JT. PPD-S was comprised of approximately 92.1% protein, 5.9% polysaccharides and 1.2% nucleic acid. *The American Review of Tuberculosis* (1944). 1944:44:9–24.
- [50] GULD J, Bentzon MW, BLEIKER MA, GRIEP WA, MAGNUSSON M, WAALER H. Standardization of a new batch of purified tuberculin (PPD) intended for international use. *Bulletin of the World Health Organization* (5). 1958:845–951.
- [51] Sbarbaro JA. Skin test antigens: an evaluation whose time has come. *The American Review of Respiratory Disease* (1). 1978:1–5. eng.
- [52] Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte eG. Rindertuberkulin PPD "WDT"-Durchstichflaschen für Tiere [Internet]. Available from: www.pharmazie.com/graphic/A/57/8-20057.pdf.
- [53] Målen H, Søfteland T, Wiker HG. Antigen analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv culture filtrate proteins. *Scandinavian Journal of Immunology* (3). 2008:245–52.
- [54] Janeway C; Murphy KP, editors. *Janeway Immunologie*. 7th ed. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl; 2009. XXVI, 1093 S. ISBN: 978-3827420473.
- [55] Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Veterinary Microbiology* (2-4). 2006:171–9.
- [56] Quinn PJ, editor. *Clinical veterinary microbiology*. Longon: Wolfe; 1994. 648 p. ISBN: 0723417113.
- [57] Richardson M, van der Spuy, G. D., Sampson SL, Beyers N, van Helden, P. D., Warren RM. Stability of Polymorphic GC-Rich Repeat Sequence-Containing Regions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* (3). 2004:1302–4.
- [58] Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 1995:29–63.
- [59] Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 2003:641–76.

-
- [60] Warren RM, Gey van Pittius, N C, Barnard M, Hesselning A, Engelke E, Kock M de, Gutierrez MC, Chege GK, Victor TC, Hoal EG, van Helden, P D. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* (7). 2006:818–22.
- [61] Dostal S, Richter E, Harmsen D. Concise guide to mycobacteria and their molecular differentiation. 1st ed. Würzburg, Germany: Ridom Press; 2003. xvi, 206. ISBN: 3833005130.
- [62] Vasconcellos, Sidra E Gonçalves, Huard RC, Niemann S, Kremer K, Santos AR, Suffys PN, Ho JL. Distinct genotypic profiles of the two major clades of *Mycobacterium africanum*. *BMC Infectious Diseases*. 2010:80.
- [63] Fuchs G; Schlegel HG; Eitinger T, editors. *Allgemeine Mikrobiologie*, 53 Tabellen. 8th ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2007. XX, 678 S. ISBN: 9783134446081.
- [64] Andersen P, Doherty TM. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature Reviews Microbiology* (8). 2005:656–62.
- [65] Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* (9517). 2006:1173–80.
- [66] Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV. The efficacy of bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. *Pediatrics* (1 Pt 1). 1995:29–35.
- [67] Copin R, Coscollá M, Efstathiadis E, Gagneux S, Ernst JD. Impact of in vitro evolution on antigenic diversity of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Vaccine* (45). 2014:5998–6004.
- [68] Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* (8986). 1995:1339–45.
- [69] Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* (7-8). 1999:915–22.
- [70] Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (13). 2007:5596–601.
- [71] Inwald J, Hinds J, Palmer S, Dale J, Butcher PD, Hewinson RG, Gordon SV. Genomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains Used for Production of Purified Protein Derivative. *Journal of Clinical Microbiology* (8). 2003:3929–32.
- [72] Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science (New York, N.Y.)* (5419). 1999:1520–3.
- [73] Mostowy S, Tsolaki AG, Small PM, Behr MA. The in vitro evolution of BCG vaccines. *Vaccine* (27-30). 2003:4270–4.
- [74] Comas I, Chakravarti J, Small PM, Galagan J, Niemann S, Kremer K, Ernst JD, Gagneux S. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nature Genetics* (6). 2010:498–503.

-
- [75] Bekmurzayeva A, Sypabekova M, Kanayeva D. Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* (Edinburgh, Scotland) (4). 2013:381–8.
- [76] van Rhijn I, Ly D, Moody DB. CD1a, CD1b, and CD1c in immunity against mycobacteria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013:181–97.
- [77] van Rhijn I, Nguyen, Thi Kim Anh, Michel A, Cooper D, Govaerts M, Cheng T, van Eden W, Moody DB, Coetzer, Jacobus A W, Rutten V, Koets AP. Low cross-reactivity of T-cell responses against lipids from *Mycobacterium bovis* and *M. avium* paratuberculosis during natural infection. *European Journal of Immunology*. (11). 2009:3031–41.
- [78] Brigl M, Brenner MB. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annual Review of Immunology*. 2004:817–90.
- [79] Dascher CC, Hiromatsu K, Xiong X, Morehouse C, Watts G, Liu G, McMurray DN, LeClair KP, Porcelli SA, Brenner MB. Immunization with a mycobacterial lipid vaccine improves pulmonary pathology in the guinea pig model of tuberculosis. *International Immunology* (8). 2003:915–25.
- [80] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemie*. 6th ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010. 1224 S. ISBN: 9783827418005.
- [81] Libero G de, Mori L. The T-Cell Response to Lipid Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in immunology*. 2014:219.
- [82] Chang ST, Linderman JJ, Kirschner DE. Multiple mechanisms allow *Mycobacterium tuberculosis* to continuously inhibit MHC class II-mediated antigen presentation by macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (12). 2005:4530–5.
- [83] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). *European Pharmacopoeia 5.0 - Statistical analysis of results of biological assays and tests*, Monographie 01/2005:50300; 2008.
- [84] Unkeless JC. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *The Journal of Experimental Medicine* (3). 1979:580–96.
- [85] Cheng, Janice M. H., Khan AA, Timmer, Mattie S. M., Stocker BL. Endogenous and Exogenous CD1-Binding Glycolipids. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* (5). 2011:1–13.
- [86] Bastian M, Braun T, Bruns H, Röllinghoff M, Stenger S. Mycobacterial lipopeptides elicit CD4+ CTLs in *Mycobacterium tuberculosis*-infected humans. *Journal of Immunology*. 2008;180(5):3436–46.
- [87] Padilla-Carlin D, McMurray, J David N, Hickey AJ. The Guinea Pig as a Model of Infectious Diseases. *Comparative Medicine* (Vol 58, No 4). August 2008:324–40.
- [88] Verordnung über den Schutz vor Schäden durch ionisierende Strahlen (Strahlenschutzverordnung), StrlSchV. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz; 20.07.2001. Available from: www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/strlschv_2001/gesamt.pdf.
- [89] Orme IM. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Immunology* (1). 1987:293–8.
- [90] Orme IM, Miller ES, Roberts AD, Furney SK, Griffin JP, Dobos KM, Chi D, Rivoire B, Brennan PJ. T lymphocytes mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Evidence for dif-

- ferent kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. *Journal of Immunology*. (1). 1992:189–96.
- [91] Floyd S, Pönnighaus JM, Bliss L, Nkhosa P, Sichali L, Msiska G, Fine, Paul E M. Kinetics of delayed-type hypersensitivity to tuberculin induced by bacille Calmette-Guérin vaccination in northern Malawi. *The Journal of Infectious Diseases* (6). 2002:807–14.
 - [92] Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guérin attenuation. *The Journal of Infectious Diseases* (1). 2003:117–23.
 - [93] McKenna KC, Beatty KM, Vicetti Miguel R, Bilonick RA. Delayed processing of blood increases the frequency of activated CD11b⁺ CD15⁺ granulocytes which inhibit T cell function. *Journal of Immunological Methods* (1-2). 2009:68–75.
 - [94] Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Belló I, Cilio CM, Wong FS, Schloot NC. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clinical and Experimental Immunology* (1). 2011:33–49.
 - [95] Watanabe Y, Watari E, Matsunaga I, Hiromatsu K, Dascher CC, Kawashima T, Norose Y, Shimizu K, Takahashi H, Yano I, Sugita M. BCG vaccine elicits both T-cell mediated and humoral immune responses directed against mycobacterial lipid components. *Vaccine* (29-30). 2006:5700–7.
 - [96] Schäfer H, Burger R. Tools for cellular immunology and vaccine research the in the guinea pig: monoclonal antibodies to cell surface antigens and cell lines. *Vaccine* (40). 2012:5804–11.
 - [97] Kasmar AG, van Rhijn I, Cheng T, Turner M, Seshadri C, Schiefner A, Kalathur RC, Annand JW, Jong A de, Shires J, Leon L, Brenner M, Wilson IA, Altman JD, Moody DB. CD1b tetramers bind $\alpha\beta$ T cell receptors to identify a mycobacterial glycolipid-reactive T cell repertoire in humans. *The Journal of Experimental Medicine* (9). 2011:1741–7.
 - [98] Grover A, Taylor J, Troudt J, Keyser A, Arnett K, Izzo L, Rholl D, Izzo A. Kinetics of the immune response profile in guinea pigs after vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG and infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* (11). 2009:4837–46.

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stark vereinfachte Darstellung der MHC-Moleküle [54]	31
Abbildung 2: Adaptiert nach Porcelli, Modlin, 1999 [24]	32
Abbildung 3: Sowohl die Aktivierung von T-Zellen als auch von B-Zellen erfolgt nach Übertragung von zwei Signalen.....	33
Abbildung 4: Schematische Darstellung der chronologischen Abfolge der Antigenbeladung eines MHC-I-Moleküls [54]	35
Abbildung 5: Hautläsionen 24 h nach Tuberkulinisierung des Meerschweinchens	43
Abbildung 6: Plattenbelegungsschema beim <i>ex vivo</i> T ζ -Proliferations-Assay	47
Abbildung 7: Vektorkarte mit Angabe der Restriktionsschnittstellen im pGEM-T Easy Vektor	53
Abbildung 8: Vektorkarte mit Angaben der Restriktionsschnittstellen des pMYC-IRES-GFP-Vektors	55
Abbildung 9: Schwach sediertes Meerschweinchen mit Hautläsionen 24 h nach Tuberkulinisierung	62
Abbildung 10: Der Tuberkulin-Hauttest zeigt dosisabhängige Hautläsionsgrößen 24 h nach intradermaler Tuberkulininjektion in sensibilisierten Meerschweinchen.	63
Abbildung 11: Die <i>ex vivo</i> Tuberkulinstimulation induziert antigenspezifische Lymphozytenproliferation in sensibilisierten Meerschweinchen.....	65
Abbildung 12: <i>Ex vivo</i> Tuberkulinstimulation induziert erst nach vorangegangener Sensibilisierung mit <i>M. bovis</i> -Stamm AN5 antigenspezifische Lymphozytenproliferation in zehn Meerschweinchen.	66
Abbildung 13: Die quantifizierbare Lymphozytenproliferation an Tag 30 ist antigenspezifisch und bedarf zwingend eine voran gegangene Sensibilisierung	67
Abbildung 14: Die Sensibilisierungsstrategie hat Einfluss auf die Intensität der durch Tuberkulinstimulation induzierten Immunantwort von isolierten gpPBMCs	69
Abbildung 15: Der dosisabhängige Messbereich des T ζ -Proliferations-Assays erstreckt sich über zwei bis drei Logarithmusstufen	71
Abbildung 16: Die Verschiebung des Wendepunkts der dosisabhängigen Kurve dient der späteren Potenzberechnung.	72
Abbildung 17: Dosisabhängige TNF α -Sekretion von aus sensibilisierten Meerschweinchen isolierten PBMCs nach Tuberkulinstimulation <i>ex vivo</i> und Durchführung des T ζ -Proliferations-Assays	73
Abbildung 18: Die Zytokinsekretion verhält sich vergleichbar zur T-Zell-Proliferation	74
Abbildung 19: Mit inaktivierter Feuchtmasse von <i>Mycobacterium bovis</i> -Stamm AN5 sensibilisierte Tiere antworten spezifisch auf bovine Tuberkuline, jedoch nicht auf das aviäre WHO-Tuberkulin.....	75
Abbildung 20: Mit inaktivierter Feuchtmasse von <i>Mycobacterium avium</i> -Stamm D4 sensibilisierte Tiere antworten spezifisch auf aviäre Tuberkuline, jedoch nicht auf das bovine WHO-Tuberkulin.....	76
Abbildung 21: Die mittels T ζ -Proliferations-Assays ermittelten Wirksamkeitsschätzer liegen bei mehrmaliger Wiederholung des Tests in einem sehr engen Bereich.	77
Abbildung 22: Der T ζ -Proliferations-Assay erzielt ähnliche Wirksamkeitsschätzer wie der Tuberkulin-Hauttest.	78

Abbildung 23: Im Herstellervergleich ermittelt der T ζ -Proliferations-Assay höhere Potenzschätzer verglichen zum Tuberkulin-Hauttest.	80
Abbildung 24: Die in beiden Methoden getesteten Chargen offenbarten einen für den jeweiligen Hersteller spezifischen Faktor, um den der T ζ -Proliferations-Assay die Wirksamkeit einer Charge höher bewertet als der TST..	82
Abbildung 25: Obwohl der T ζ -Proliferations-Assay die Potenzen der Testchargen höher schätzt als der Tuberkulin-Hauttest, korrelieren beide Methoden sehr gut miteinander.	83
Abbildung 26: Unter Berücksichtigung des herstellerspezifischen Korrekturfaktors lässt sich die Korrelation beider Methoden zueinander auf 90 % steigern.	84
Abbildung 27: Der T ζ -Proliferations-Assay detektiert vor allem mykobakterielle Lipidstrukturen, wohingegen der Tuberkulin-Hauttest auf Proteinantigene zu reagieren scheint	87
Abbildung 28: Anhand des grün fluoreszierenden Reporterproteins GFP konnten erfolgreich transduzierte 38B9-Zellen mikroskopisch visualisiert werden..	89
Abbildung 29: Nach 24 h <i>in vitro</i> Stimulation mit gpGM-CSF und gpIL4 steigt die CD1-Expression auf von Monozyten abgeleitete antigenpräsentierenden Zellen..	90
Abbildung 30: Die Steigerung der CD1-Expression auf durch Plastikadhärenz angereicherten Monozyten konnte zuverlässig auf Zellen von Dunkin-Hartley-Meerschweinchen nach 24-stündiger Zytokinstimulation gemessen werden.....	91
Abbildung 31: Nach der Sensibilisierung ist eine CD1-restringierte T-Zell-Antwort auf mykobakterielle Lipidantigene im Meerschweinchen <i>ex vivo</i> induzierbar.	92
Abbildung 32: Die Anwesenheit von CD1-positiven antigenpräsentierenden Zellen ist essentiell für die Quantifizierung der <i>ex vivo</i> Immunantwort auf mykobakterielle Lipidantigene	93
Abbildung 33: Rohdatenblattvorlage zur Dokumentation der mittels Lineal ermittelten Durchmesser der Hautläsionen 24 h nach der Tuberkulinisierung.....	112
Abbildung 34: Exemplarische Auswertung für die im TST ermittelten Daten eines Meerschweinchenindividuums mittels CombiStats-Software zur Potenzermittlung eines Testtuberkulins gegen ein Referenztuberkulin unter Nutzung des Parallel-Line-Assays	113
Abbildung 35: Exemplarischer Screenshot einer CombiStats-Auswertung von im T-Zell-Proliferations-Assay erhobener Daten unter Nutzung des Sigmoid-Curve-Models.....	114

12. Abkürzungsverzeichnis

APCs	Antigen presenting cells – Antigenpräsentierende Zellen
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BES-Puffer	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure-Puffer
BoLA	Bovine Leukocyte Antigen
BRD	Bundesrepublik Deutschland
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation – Unterscheidungsgruppen
CFP-10	Culture Filtrate Protein
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CLIP	class-II-associated invariant-chain peptide
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DCs	Dendritic Cells – Dendritische Zellen
DDR	Deutsch Demokratische Republik
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinacid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESAT-6	Early Secreted Antigenic Target
FACS	Fluorescence Associated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FSC	Forward Scatter - Vorwärtsstreulicht

Abkürzungsverzeichnis (kont.)

GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GMM	Glucosemonomycolat
gp	Meerschweinchen (engl. Guinea Pig)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
IE	Internationale Einheit
IFN γ	Interferon-gamma
IL2	Interleukin 2
IL4	Interleukin 4
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
IU	Engl. International Unit
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
LMP	Low Molecular Mass Polypeptide
MIIC	MHC-II-Compartment
ManLAM	Mannosyliertes Lipoarabinomannan
MCS	Multiple cloning site
MECL-1	Multicatalytic Endopeptidase Complex Like
MHCI und MHCII	Majorhistocompatibilitycomplex I und II - Majorhistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
MOTT	Mycobacteria Other Than Tuberculosis
NEB	New England Biolabs

Abkürzungsverzeichnis (kont.)

OT	Koch`s old Tuberculin
PA	Proteasom Activator
PBS	Phosphat Buffered Saline
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells – Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PCR	Polymerase Chain Reaction – Polymerase-Kettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin
PIM ₂	Phosphatidylinositol-di-mannosid
PPD	Purified Protein Derivative
PPD-S	PPD-Standard
PRR	Pattern Recognition Receptor
RD	Region of Difference
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism - Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonucleinacid - Ribonukleinsäure
rpm	rotation per minute – Umdrehungen pro Minute
SF-IMDM	Iscove modified Dulbecco medium (Bio-chrom, supplied as powder) supplement-ed with nonessential amino acids, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen), β-Mercaptoethanol (50 µM), glutamine (4 mM), 0,03 % (w/v) Primatone RL (Quest, 559051), 5 µg/mL insulin (I5500, Sigma-Aldrich)
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SOTT	synthetic medium old tuberculin trichlo-roacetic acid precipitate
SSC	Side Scatter - Seitwärtsstreulicht

Abkürzungsverzeichnis (kont.)

TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TB	Tuberkulose
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure (engl. Trichloroacetic acid)
TCR	T-Cell-Receptor – T-Zell-Rezeptor
TMB-Substrat	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrat
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TST	Tuberkulin Skin Test (Tuberkulin-Hauttest)
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TU	Tuberculin Unit
WHO	World Health Organisation
ZAP	Zeta-chain-associated protein kinase

13. Publikationen

Schriftliche Publikationen in wissenschaftlichen Journalen

- 1) Christina Spohr, Eva Kaufmann, Sibylle Battenfeld, Karin Duchow, Klaus Cussler, Elisabeth Balks und Max Bastian; **A New Lymphocyte Proliferation Assay for Potency Determination of Bovine Tuberculin PPDs**; ALTEX-Journal, Epub 03. Mai 2014
- 2) Eva Kaufmann, Christina Spohr, Sibylle Battenfeld, Diane De Paepe, Elisabeth Balks, Norbert Reiling, Martine Gilleron und Max Bastian; **Experimental BCG vaccination induces lipopeptide reactive T cells specific for Mycobacteria of the Mycobacterium tuberculosis complex**; in Vorbereitung

Poster- oder Vortragspräsentationen auf wissenschaftlichen Kongressen

- Posterpräsentation auf dem 6th Annual PEI-Retreat on Biomedical Research in Löwenstein, 13.-15. Januar 2012
- Posterpräsentation auf dem 7th Annual PEI-Retreat on Biomedical Research in Löwenstein, 18.-20. Januar 2013
- Vortrag auf dem 17. Minisymposium „Infektion und Immunabwehr“ Burg Rothenfels, 21.-23. März 2013
- Vortrag auf dem 8th Annual PEI-Retreat on Biomedical Research in Heidelberg, 15.-17. Januar 2014
- Vortrag auf dem 18. Minisymposium „Infektion und Immunabwehr“ Burg Rothenfels, 12.-14. März 2014
- Vortrag auf dem 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences in Prag, 24.-28. August 2014
- Posterpräsentation auf dem 9th Annual PEI-Retreat on Biomedical Research in Heidelberg, 21.-23. Januar 2015 - **Poster Prize 3rd place.**

14. Curriculum vitae

Personal Data

Name	Spohr
First Name	Christina
Date of birth	01.11.1984
Place of birth	Fulda
Nationality	German

Work experience

11/2011 – 01/2015	PhD student at the Paul-Ehrlich-Institute in Langen (Hesse) Division of Veterinary Medicine – Group of Dr. Max Bastian Title of the thesis: „Establishment of an <i>ex vivo</i> proliferation assay as 3R alternative method for batch potency testing of bovine Tuberculin considering mycobacterial lipid antigens”
-------------------	---

Education

10/2004 – 05/2011	Studies in biology at the Technical University in Darmstadt, Germany Focus on Biochemistry, Cell- and Developmental Biology, Microbiology, Animal Physiology Extern Diploma (corresponding to MSc) thesis at Harlan Cytotest Cell Research GmbH; Rossdorf, Germany “Establishment and validation of a non-radioactive Local Lymph Node Assays (LLNA) with flow cytometric endpoints”
Until 06/2004	Abitur (corresponding entrance qualification) at Grimmelshausen-Gymnasium Gelnhausen, Germany

Conferences

- Posterpresentation at 7th Annual PEI-Retreat on Biomedical Research in Löwenstein, 18.-20. January 2013
- Oral talk at 17th Minisymposium „Infektion und Immunabwehr“, Burg Rothenfels, 21.-23. March 2013
- Oral talk at 8th Annual PEI-Retreat on Biomedical Research in Heidelberg, 15.-17 January 2014
- Oral talk at 18th Minisymposium „Infektion und Immunabwehr“, Burg Rothenfels, 12.-14. March 2014
- Oral talk at 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences in Prague, 24.-28. August 2014
- Posterpresentation at 9th Annual PEI-Retreat on Biomedical Research in Heidelberg, 21.-23. January 2015

Advanced Training

09/2011	Course “Laboratory Animal Science and Methods of Animal Experimentation”; Ruprecht-Karls-University Heidelberg (FELASA, B)
---------	--

15. Ehrenwörtliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Dr. med. vet. Max Bastian in der Abteilung Veterinärmedizin am Paul-Ehrlich-Institut in Langen vom 01. November 2011 bis Juni 2015 angefertigt.

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 06. Juli 2015

Christina Spohr

16. Danksagung

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörg Simon und Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer vom Institut für Mikrobiologie und Genetik an der TU Darmstadt für die Betreuung und Überprüfung dieser Arbeit im Rahmen der Promotion. Herr Prof. Simon stand ratgebend zur Seite und vermittelte mir immer eine positive Ruhe in Promotionsangelegenheiten.

Herrn Dr. Max Bastian von der Abteilung Veterinärmedizin am Paul-Ehrlich-Institut in Langen danke ich von Herzen für die Bereitstellung eines Projekts mit motivierender Intension. Als mein Betreuer vor Ort bestritten wir den manchmal harten Weg der letzten drei Jahre gemeinsam.

Ich danke meinem ganzen Thesis-Committee am Paul-Ehrlich-Institut: Dr. Veronika von Messling, Prof. Dr. Stefan Vieths, PD Dr. Ger van Zandbergen und Dr. Holger Lößner. Sie lehrten mich Aspekte wissenschaftlicher Denkstrukturen, die sie in mir durch präzise Fragestellung erarbeitet haben und trugen damit zum Gelingen des Projekts bei. Dr. Elisabeth Balks und Dr. Beate Krämer danke ich für die Bereitstellung ihrer Erfahrung. Dr. Jörg Kirberg und Kay-Martin-Hanschmann danke ich für ihre Unterstützung. Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Plesker und den TierpflegerInnen.

Besonderen Dank gilt Friederike Mohs, die den Arbeitsalltag bald auch als Freundin mit mir bestritt. Sibylle, Anna, Eva, Rahel und allen anderen LaborkollegInnen und BürositznachbarnInnen danke ich für den Beitrag, den sie zu diesem Projekt geleistet haben. Theresa danke ich für den täglichen und für mich so wichtigen Austausch.

Abschließend danke ich in Dankbarkeit an alle Menschen, denen ich viel terminliche Flexibilität und Geduld abverlangt habe. Das betrifft meine Familie, meine Freunde – in Darmstadt vor allem Johanna und alle, die mich begleiten. Sie haben mir stets ein gutes Gefühl gegeben, mich voran gebracht und immer zugehört – sowohl tags als auch nachts. Meiner Mutter an dieser Stelle einfach Danke zu sagen, reicht nicht aus. Sie soll innig und tiefverbunden umarmt werden.

Darmstadt 2015

Christina